

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA**

**Scienze Veterinarie**

**Ciclo XXVI**

Settore concorsuale di afferenza: **07/H2**

Settore scientifico disciplinare: **VET/04**

**Messa a punto e validazione di metodiche  
analitiche per la determinazione di micotossine in  
matrici biologiche mediante UPLC-MS/MS**

Presentata da: **Dott.ssa Martina Scardilli**

Coordinatore del dottorato:

**Prof. Carlo Tamanini**

Relatore:

**Dott.ssa Teresa Gazzotti**

**Esame finale anno 2014**

<b>INDICE</b>	<b>2</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
<b>1.1 LE MICOTOSSINE</b>	<b>6</b>
<b>1.1.1 Cenni generali di micologia</b>	<b>6</b>
1.1.1.1 <i>Cenni generali di sviluppo</i>	12
1.1.1.2 <i>Contaminazioni fungine delle produzioni alimentari e                     Zootecniche</i>	14
<b>1.1.2 Aflatossine</b>	<b>20</b>
<b>1.1.3 Fumonisine</b>	<b>27</b>
<b>1.1.4 Ocratossine</b>	<b>32</b>
<b>1.1.5 Tricoteceni</b>	<b>37</b>
<b>1.1.6 Zeralenoni</b>	<b>41</b>
<b>1.2 METODI CONTROLLO E PREVENZIONE</b>	<b>45</b>
<b>1.3 LEGISLAZIONE</b>	<b>47</b>
<b>1.4 METODI DI ANALISI</b>	<b>56</b>
<b>2 SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>64</b>
<b>3 MATERIALI E METODI</b>	<b>65</b>
<b>3.1 PETFOOD</b>	<b>65</b>
<b>3.1.1 MATERIALI ED ATTREZZATURE</b>	<b>65</b>
3.1.1.1 <i>UPLC-MS/MS</i>	65
3.1.1.2 <i>Altri materiali ed attrezzature</i>	66
3.1.1.3 <i>Campioni</i>	68
<b>3.1.2 MODALITA' DI ESECUZIONE DELLA PROVA</b>	<b>71</b>
3.1.2.1 <i>Preparazione delle soluzioni standard</i>	71
3.1.2.2 <i>Estrazione del campione</i>	72
3.1.2.3 <i>Condizioni strumentali – Cromatografia liquida</i>	74
3.1.2.4 <i>Condizioni strumentali – Spettrometria di massa</i>	75
<b>3.1.3 VALIDAZIONE DEL METODO</b>	<b>78</b>
3.1.3.1 <i>Linearità</i>	78

3.1.3.2	Specificità	79
3.1.3.3	Sensibilità – Limite di determinazione (LOD) e di quantificazione ( LOQ)	79
3.1.3.4	Esattezza e precisione	80
3.1.3.5	Quantificazione dei campioni	80
3.1.3.6	Valutazione della soppressione ionica	81
<b>3.2</b>	<b>FORMAGGIO</b>	<b>82</b>
<b>3.2.1</b>	<b>MATERIALE ED ATTREZZATURE UTILIZZATE</b>	<b>82</b>
3.2.1.1	UPLC-MS/MS	82
3.2.1.2	Altri materiali ed attrezzature	82
3.2.1.3	Campioni	83
<b>3.2.2</b>	<b>MODALITA' PER L'ESECUZIONE DELLA PROVA</b>	<b>84</b>
3.2.2.1	Preparazione delle soluzioni standard	84
3.2.2.2	Estrazione del campione	84
3.2.2.3	Condizioni strumentali – Cromatografia liquida	58
3.2.2.4	Condizioni strumentali – Spettrometria di massa	85
<b>3.2.3</b>	<b>VALIDAZIONE DEL METODO</b>	<b>86</b>
3.2.3.1	Linearità	86
3.2.3.2	Specificità	87
3.2.3.3	Sensibilità	87
3.2.3.4	Esattezza e precisione	88
3.2.3.5	Valutazione della soppressione ionica della matrice	88
<b>4</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONI</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>PET FOOD</b>	<b>89</b>
<b>4.1.1</b>	<b>MESSA A PUNTO DEL METODO</b>	<b>89</b>
4.1.1.1	Condizioni strumentali - Cromatografia liquida	89
4.1.1.2	Condizioni strumentali - Spettrometria di massa	90
4.1.1.3	Estrazione del campione	90
<b>4.1.2</b>	<b>VALIDAZIONE DEL METODO</b>	<b>92</b>
4.1.2.1	Linearità	92
4.1.2.2	Specificità	96

4.1.2.3	<i>Sensibilità - Limite di determinazione (LOD) e di quantificazione ( LOQ)</i>	96
4.1.2.4	<i>Esattezza e precisione</i>	98
4.1.2.5	<i>Campioni</i>	100
<b>4.2</b>	<b>FORMAGGIO</b>	<b>107</b>
4.2.1	<b>Messa a punto del metodo</b>	107
4.2.1.1	<i>Condizioni strumentali - Cromatografia liquida</i>	107
4.2.1.2	<i>Condizioni strumentali - Spettrometria di massa</i>	107
4.2.1.3	<i>Estrazione del campione</i>	108
4.2.2	<b>Validazione del metodo</b>	<b>110</b>
4.2.2.1	<i>Linearità</i>	111
4.2.2.2	<i>Specificità</i>	114
4.2.2.3	<i>Sensibilità – Limite di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ)</i>	114
4.2.2.4	<i>Esattezza e precisione</i>	115
4.2.2.5	<i>Campioni</i>	116
4.2.2.6	<i>Applicazione del metodo</i>	116
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>117</b>
5.1	<b>PET FOOD</b>	<b>117</b>
5.2	<b>FORMAGGIO</b>	<b>118</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>119</b>

# 1. INTRODUZIONE

---

Le micotossine sono metaboliti secondari tossici prodotti da funghi appartenenti, essenzialmente, genere *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Questi composti chimici presenti in natura possono essere riscontrati su una vasta gamma di prodotti agricoli in tutto il mondo ([www.fao.org/](http://www.fao.org/)); possono svilupparsi prima e dopo la raccolta, durante i processi di conservazione, durante la trasformazione o il trasporto.

L'accumulo di micotossine negli alimenti e mangimi rappresenta una grave minaccia per la salute umana e animale in quanto responsabili di molti effetti tossici presentando attività nefrotossica, epatotossica, mutagenica, teratogena, immunotossica e cancerogena (Colavita *et al.* 2008).

Vi è la necessità di tutelare la salute dell'uomo e degli animali sensibili limitando la loro esposizione alle micotossine. Nonostante i molti anni di ricerca, e l'introduzione di buone prassi nella catena di produzione alimentare, conservazione e distribuzione, le micotossine continuano ad essere un problema.

A causa della loro importanza per la salute pubblica e per l'impatto commerciale, molti paesi regolamentano e fissano i livelli di micotossine consentiti in alimenti e mangimi ([www.fao.org/](http://www.fao.org/)).

# 1.1 LE MICOTOSSINE

## 1.1.1 CENNI GENERALI DI MICOLOGIA

La micologia è la scienza che studia i funghi (dal latino *fungus*), o miceti (dal greco *miko*) (Tampieri 2004).

I miceti, con decine di migliaia di specie di muffe, lieviti e funghi sono probabilmente gli organismi più diffusi in natura (Dragoni *et al.* 1997). L'azione svolta dai miceti in natura è estremamente varia ed importante: rientrano all'interno di numerosi processi metabolici, sono, insieme ai batteri, i principali organismi decompositori della materia organica e sono presenti in tutti gli ambienti, inclusi quelli più ostili.

Le branche pertinenti lo studio della micologia possono essere distinte in:

- **Micologia generale** relativa allo studio della morfologia, biologia, biochimica, filogenesi e tassonomia.
- **Micologia industriale** relativa allo studio dei:
  - funghi che interessano l'industria alimentare (processi fermentativi);
  - funghi che interessano l'industria farmaceutica (antibiotici o altre sostanze).
- **Micologia medica** (umana e veterinaria) relativa allo studio dei funghi patogeni e i relativi effetti sull'ospite:
  - ***Micosi*** riguardante malattie o infezioni determinate dall'invasione di funghi che parassitano l'ospite con sintomatologia variabile;
  - ***Micotossicosi*** riguardante l'avvelenamento o intossicazione dovute all'ingestione di derrate alimentari contenenti tossine prodotte da alcuni generi di funghi;

- **Micetismo** riguardante l'avvelenamento o intossicazione dovuta all'ingestione di funghi velenosi (*A.phalloides*, *A. muscaria*, *B. satanas*);
- **Allergie** da spore fungine respiratorie e cutanee (Tampieri 2004).

Per quanto riguarda le caratteristiche generali i miceti o funghi possono essere distinti in macromiceti (grandi, divisi in ipogei ed epigei) o micromiceti (piccoli) (Tampieri 2004) e comunque caratterizzati da un apparato vegetativo chiamato *micelio* (Dragoni *et al.* 1997), principalmente valgono le seguenti caratteristiche:

- sono organismi eterotrofi (mancano di clorofilla) e quindi per vivere necessitano di:
  - sostanze organiche in decomposizione (*funghi saprofiti*),
  - materiale organico prelevato da organismi viventi (*funghi parassiti*),
  - materiale organico vegetale munito di clorofilla (*funghi simbiotici*);
- sono organismi eucarioti pertanto il genoma è contenuto all'interno di un nucleo provvisto di membrana (Tampieri 2004);
- sono organismi pluricellulari e unicellulari con prevalenza dei primi (Dragoni *et al.* 1997);
- sono organismi aerobi oppure anaerobi facoltativi (non esistono funghi anaerobi obbligati);
- sono organismi non mobili;
- sono organismi provvisti di parete cellulare rigida;

- sono organismi in grado di riprodursi purché siano verificate determinate condizioni (*fattori intrinseci* propri del micete e *fattori estrinseci* propri dell'ambiente quali umidità, ossigeno, temperatura, ph):
  - riproduzione sessuata (*telemorfi* o *perfetti*) mediante la formazione di spore e conidi dispersi nell'ambiente: *zigospore* (spore a parete spessa) tipiche degli Zygomycota, *ascospore* (spore portate internamente ad un sacco denominato asco) tipiche degli Ascomycota, *basidiospore* (spore portate esternamente in una struttura denominata basidio) tipiche dei Basidiomycota,
  - riproduzione asessuata (*anamorfi* o *imperfetti*) mediante scissione binaria, gemmazione, formazione di spore (o conidi) esogene che originano all'apice di una ifa conidiogena e/o spore esogene (o sporangio spore) all'interno di una struttura sacchiforme detta sporangio,
  - riproduzione sessuata e asessuata (*olomorfi*):
- sono organismi dotati di forma:
  - filamentosa (**muffe**) la cui struttura principale è un filamento mono- o pluricellulare detta *ifa* (non settato, settato, semplice, ramificato, intrecciato) che si sviluppa apicalmente da una spore che emette un tubo germinativo, conglomerate a formare il *micelio* (vegetativo e aereo o riproduttivo);
  - organismi unicellulari (**lieviti**) rotondeggianti oppure ovali, dai 3 ai 15  $\mu$ , si riproducono per via sessuata e asessuata per gemmazione mediante *blastospore* che possono staccarsi dalla cellula madre oppure restare parzialmente unite a formare *pseudoife* o *pseudo miceli*;



- Dimorfi in quanto caratterizzati da una elevata variabilità morfologica strettamente correlata alle condizioni ambientali di crescita (dimorfismo termo-dipendente).

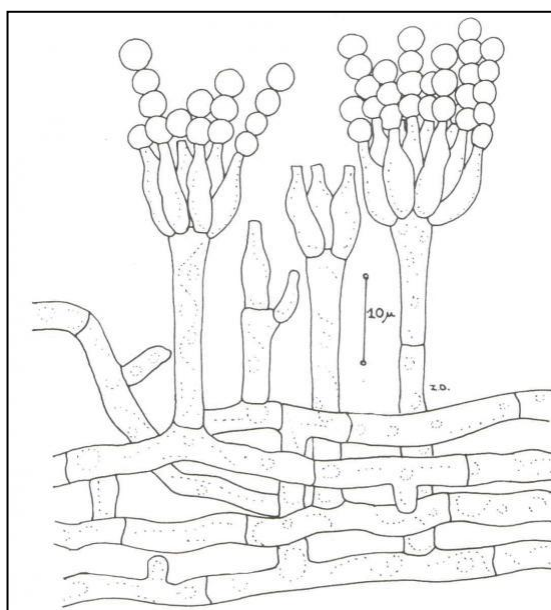
Per quanto riguarda la invece la classificazione e la tassonomia dei miceti, essa è tuttora oggetto di molteplici discussioni e altrettante controversie riguardanti numerosi aspetti quali la pigmentazione, la temperatura di crescita, la modalità di riproduzione, o altro ancora (Tampieri 2004). Oggi gli studiosi tendono a considerare i miceti addirittura come una categoria biologica a sé stante, in continua evoluzione, con caratteristiche che le permettono una eccezionale capacità di adattamento e di trasformazione. Una prima distinzione può essere fatta in base all'apparato vegetativo:

- Eumiceti: miceti che presentano un micelio vero e proprio,
- Mixomiceti: miceti che non presentano un micelio differenziato (Dragoni *et al.* 1997);

sulla base delle differenze nell'apparato riproduttivo è convenzione classificare i miceti all'interno del Regno dei Funghi, e suddividerli in:

- *Ascomycota*: funghi unicellulari e filamentosi a micelio settati con riproduzione sessuata mediata da ascospore. La maggior parte dei funghi patogeni appartiene a questo Phylum;
- *Basidiomycota*: funghi unicellulari e filamentosi a micelio scarsamente settato con riproduzione sessuata mediata da Basidiospore, possiedono minore importanza nel sostenere malattie in animali e uomo;
- *Zigomycota*: funghi con micelio scarsamente settato, cenocitrico con riproduzione sessuata mediata da zigospore. A questo gruppo appartengono pochi patogeni (Tampieri 2004);
- *Chytridiomycota*: funghi microscopici e spesso unicellulari (Dragoni *et al.* 1997);

- *Deuteromycota*: detti anche funghi imperfetti, sono funghi unicellulari o filamentosi a micelio settato che non hanno uno stadio sessuale conosciuto (Tampieri 2004). Rappresentano la classe di muffe più importanti dal punto di vista alimentare, annoverano le specie più comuni capaci di contaminare gli alimenti (Figura 1.1) e quelle che intervengono nei processi produttivi alimentari e farmaceutici (Dragoni *et al.* 1997).



**Figura 1.1. *Penicillium* spp. (deuteromycota), micelio settato (Dragoli *et al.* 1997).**

Nella Tabella 1.1 vengono riportati i principali gruppi di miceti responsabili della contaminazione degli alimenti.

Tuttavia va precisato come non esista una classificazione rigida di questi microrganismi, problemi di nomenclatura originano da una incompleta conoscenza dell'evoluzione molecolare di questi microrganismi che porta ad una gerarchia evolutivistica non chiara che non riesce a mettere d'accordo autori e studiosi della materia. Un'interessante disquisizione in merito all'argomento viene fornita da D.J. McLaughlin e W.G. McLaughlin nel volume VII del trattato "The Mycota" (Esser *et al.* 2001).

**Tabella 1.1. Classificazione dei principali gruppi di miceti che contaminano gli alimenti.**

\* Nome della corrispondente forma imperfetta (con riproduzione osservata) (Dragoni et al. 1997)

CLASSE	ORDINE	FORME RIPROD. CARATTERISTICHE	GENERE
<b>Ficomycota</b>	Mucorali (Zigomiceti)	Zigospore e Sparangio	<i>Absidia</i> <i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i> <i>Thamnidium</i> <i>Syncephalastrum</i>
			<i>Byssoschlamys</i> <i>Eurotium</i> *( <i>Asoergillus</i> gr. <i>Glaucus</i> ) <i>Emericella</i> *( <i>Aspergillus</i> gr. <i>Nudalus</i> ) <i>Eupenicillium</i> *( <i>Penicillium</i> )
<b>Ascomycota</b>	Eurotiali	Aschi e Ascospore	
	Microscali	Aschi e Ascospore	<i>Chaetonium</i>
	Sferiali	Aschi e Ascospore	<i>Neurospora</i> *( <i>Monilia</i> )
		Aleurioconidi	<i>Trichothecium</i>
		Anelloconidi	<i>Scopulariopsis</i>
		Balstoconidi	<i>Alternaria</i> <i>Botrys</i> <i>Cladosporium</i> <i>Monilia</i> <i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i> <i>Paecilomyces</i>
<b>Deuteromycota</b>	Ifali	Fialoconidi	<i>Penicillium</i> <i>Stachybotrys</i> <i>Trichoderma</i> <i>Verticillium</i>
	Sferopsidali	Conidi	<i>Phoma</i>

### 1.1.1.1 **Condizioni generali di sviluppo**

Come accennato nel paragrafo precedente (*paragrafo 1.1.1*), affinché avvenga la riproduzione del micete, oltre a determinati *fattori intrinseci* propri dell'organismo fungino, sono necessari *fattori estrinseci* (ambientali) quali (Dragoni *et al.* 1997):

➤ **Temperatura:** la maggior parte delle muffe si sviluppa tra i 15 e 30 °C, con una crescita ottimale intorno ai 20 – 25 °C, eppure data la notevole biodiversità che caratterizza questi organismi permette di suddividerli come segue:

- muffe termofile crescono bene tra i 20-50 °C, con particolarità per le *microtermofile* che hanno una temperatura di crescita ottimale compresa tra i 25-35 °C e massima compresa tra i 40-48 °C; *termofile psicotolleranti* crescono bene a 48 °C (*Aspergillus Fumigatus*); *termofile vere* crescono bene tra i 40-50 °C con punte massime fino ai 60 °C;
- muffe termo tolleranti hanno una temperatura massima di crescita che raggiunge i 50°C e temperatura minima molto inferiore ai 20 °C (*Aspergillus niger*);
- muffe mesofile crescono bene tra i 10-40 °C con una temperatura ottimale intorno ai 25 °C;
- muffe psicofile crescono a temperature ottimali comprese tra i 5-10 °C;
- muffe criofile crescono a temperature inferiori ai 5 °C (Dragoni *et al.* 1997).

➤ **L'acqua libera (*Aw, water activity*):** rappresenta una quota dell'umidità totale disponibile per la crescita dei microrganismi. Ponendo per l'acqua un valore di *Aw* pari a 1, risulta intuitivo come

tutti gli altri substrati possiedano un valore di Aw diverso da 1, ovvero inferiore. In base alla necessità di Aw le muffe possono essere distinte in:

- Muffe xerofile, le cui spore germinano ad un valore di Aw inferiore a 0,80 e crescita ottimale intorno a 0,95 di Aw (*Aspergillus spp*);
- Muffe mesofile, le cui spore germinano a valori di Aw compresi tra 0,80-0,90 e crescita ottimale tra 0,90-1 di Aw;
- Muffe igrifile, le cui spore germinano a valori di Aw superiori a 0,90 e crescita ottimale intorno a 1 di Aw.

➤ **Ph:** la maggior parte delle muffe si sviluppa a valori compresi tra 4-8, e a seconda del ph del substrato possono essere divise in:

- Acidofile crescono a ph compreso tra 4,5-5;
- Subacidofile crescono a ph compreso tra 5-6;
- Neutrofile crescono a ph compreso tra 6-7;
- Subalcalofile crescono a ph compreso tra 7-8,5;
- Alcalofile crescono a ph superiore a 9.

➤ **Ossigeno:** necessario per le specie aerobie che crescono prevalentemente sulla superficie del substrato, mentre le specie anaerobie facoltative riescono a crescere anche in profondità (Dragoni *et al.* 1997).

### **1.1.1.2 Contaminazioni fungine nelle produzioni alimentari e zootecniche**

Riprendendo l'aspetto legato alla micologia industriale relativa allo studio dei funghi che interessano l'industria alimentare, nonché la micologia medica relativa allo studio dei funghi patogeni e i rispettivi effetti dovuti all'ingestione di derrate alimentari contenenti tossine prodotte da alcuni generi di funghi, la contaminazione fungina può interessare numerosi substrati quali:

- **Acqua** ad opera di specie fungine appartenenti ai generi *Mucor*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Acremonium*;
- **Bevande** diverse dall'acqua, ad opera di specie fungine appartenenti ai generi *Byssochlamys*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*;
- **Carne e salumi** ad opera di specie fungine appartenenti ai generi *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Thamnidium*, *Wallemia*, *Scopulariopsis*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*;
- **Uova** ad opera di specie fungine appartenenti ai generi *Cladosporium*, *Mortierella*, *Sporotrichum*, *Mucor*, *Thamnidium*, *Botrys*, *Alternaria*, *Trichotecium*, *Verticillium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, e *Fusarium*;
- **Spezie** ad opera di specie fungine appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*;
- **Frutta secca** ad opera di specie fungine appartenenti ai generi, *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Syncephalastrum*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*;
- **Cereali e derivati** ad opera di specie fungine appartenenti ai generi *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Chaetomium*, *Trichoderma*,

*Monilia, Absidia, Byssosclamyces, Paecilomyces, Aspergillus, Penicillium e Fusarium;*

- **Latte e derivati** ad opera di specie fungine appartenenti ai generi *Cladosporium, Alternaria, Phoma, Epicoccum, Geotrichum, Paecilomyces, Thamnidium, Mucor, Penicillium, Aspergillus e Fusarium;*
- **Prodotti zootecnici** ad opera di “muffe di campo” appartenenti ai generi *Fusarium, Alternaria, Cladosporium, Epicoccum, Trichoderma, Chaetomium,* o “muffe di stoccaggio” appartenenti ai generi *Mucorli, Aspergillus, Penicillium* (Dragoni *et al.* 1997).

Tuttavia in virtù della capacità di adattamento e di tutte le specie fungine i in generale, non limitatamente ad *Aspergillus, Penicillium, Fusarium,* è corretto affermare che “tutte le specie fungine possono presentare ceppi tossigeni in determinate condizioni di crescita”, ed è per questo motivo che l’elenco delle tossine identificate come metaboliti secondari di funghi si fa sempre più lungo con il procedere della ricerca scientifica; si tratta spesso di specie fungine *potenzialmente tossigene* i cui effetti studiati in vitro e/o in vivo risultano parziali rispetto a quelli riscontrati nella realtà dove le variabili sono esasperate da molteplici fattori difficilmente riproducibili in laboratorio (Dragoni *et al.* 1997).

Dal punto di vista della salute umana sono le materie prime impiegate per la produzione di derrate alimentari e i prodotti di origine animale a rappresentare la principale fonte di assunzione di micotossine, mentre nel primo caso la contaminazione è a carico delle materie prime (cereali, farine, spezie, frutta secca etc.), nei prodotti di origine animale la presenza di micotossine è dovuta esclusivamente a un effetto *carry-over* che si verifica in seguito all’impiego di mangimi zootecnici (quindi materie prime) contaminati (Colavita *et al.* 2008).

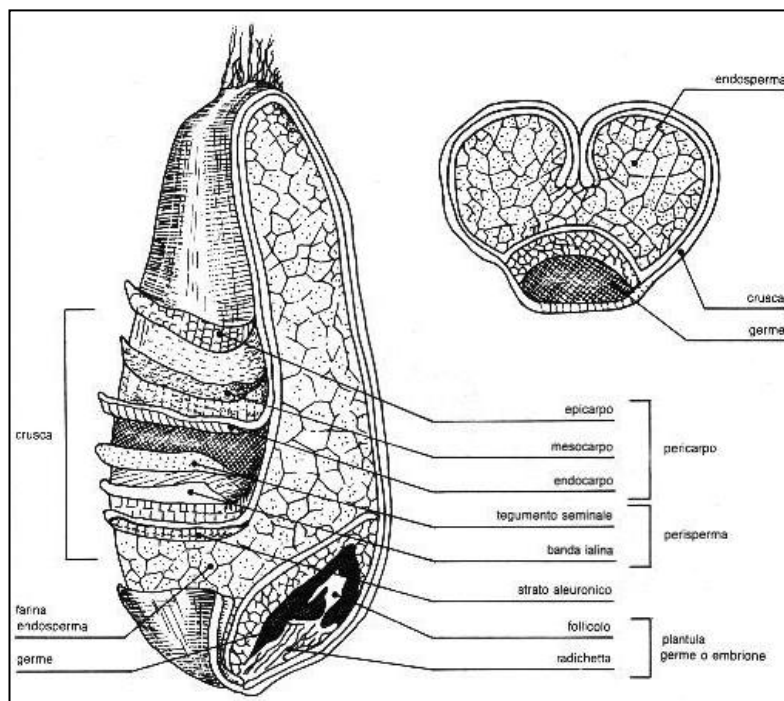
Le granaglie costituiscono un buon terreno di crescita per molte specie fungine che riescono ad abbattere facilmente le barriere strutturali tipiche dei semi. La contaminazione può avvenire prima del raccolto (*contaminazione in campo*) ad opera soprattutto dei generi *Fusarium*, che colpisce soprattutto le spighe ancora in fiore, oppure durante la fase di stoccaggio in silos dove la flora di campo regredisce e si sviluppa una flora fungina costituita soprattutto dai generi *Aspergillus* e *Penicillium* (Tabella 1.2) (Dragoni *et al.* 1997).

**Tabella 1.2. Principali muffe che contaminano i prodotti zootecnici (Dragoni *et al.* 1997).**

SPECIE FUNGINE “DI CAMPO”	SPECIE FUNGINE “DI STOCCAGGIO”
<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Aspergillus candidus</i>
<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Aspergillus repens</i>
<i>Alternaria spp</i>	<i>Aspergillus viridicolor</i>
<i>Cladosporium spp</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>
<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium stoloniferum</i>
<i>Trichoderma viride</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>
<i>Chaetomium globosus</i>	<i>Mucor spp</i>
	<i>Rhizopus nigricans</i>
	<i>Absidia corymbifera</i>



Le cariossidi (Figura 1.2) dei cereali destinate all'alimentazione umana (riso, orzo, frumento, mais etc.) vengono sottoposte a lavorazioni industriali per privarle della parte più esterna, pericarpo e perisperma, solo per il riso e l'orzo il nucleo della cariosside viene utilizzato intero previa brillatura. Gli altri cereali vengono utilizzati sotto forma di farine.



**Figura 1.2. Cariosside di frumento.**

Le muffe (e le potenziali micotossine) presenti nella farina sono il riflesso dei cereali da cui deriva, la macinazione dei cereali che frammenta il micelio determina una dispersione delle spore determinando una contaminazione della farina maggiore rispetto alla materia prima da cui la farina proviene. Tuttavia va precisato che i metodi di stoccaggio degli sfarinati tendono a diminuire il numero di specie fungine presenti, in quanto rispettano condizioni di disidratazione caratteristiche delle farine (con ulteriore riduzione della Aw rispetto allo stoccaggio delle materie prime).

La presenza di muffe in una farina determina alterazioni organolettiche, chimiche, igieniche e sanitarie come la formazione di micotossine quali Aflatossine B1, B2, G1, G2, e ocratossine A e B.

Dal punto di vista zootecnico l'importanza delle materie prime per la produzione di mangimi è legata sia alla salute e al benessere dell'animale che a quella del consumatore.

La crescita delle muffe in campo (Figura 1.3) è favorita da diversi fattori climatici come l'umidità relativa dell'aria, le condizioni meteorologiche e il regime idrico. La raccolta pertanto costituisce una delle operazioni più critiche e diversi accorgimenti (di cui si accennerà nel *paragrafo 1.2*) risultano fondamentali per ottenere un raccolto conforme (Dragoni *et al.* 1997).

La Tabella 1.3 riassume la relazione tra le specie fungine e le relative micotossine prodotte di cui si è accennato nei paragrafi precedenti e che verranno successivamente approfondite.



**Figura 1.3. Mais e muffe (aspetto macroscopico).**

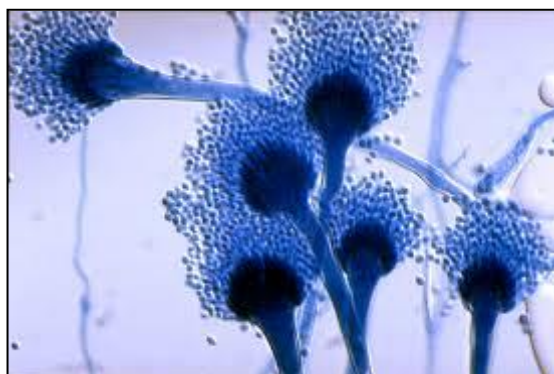
**Tabella 1.2. Principali specie fungine e relative micotossine prodotte (Dragoni *et al.* 1997).**

FUNGHI	MICOTOSSINE
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus numius</i>	Aflatossine B1, B2, G1, G2
<i>Penicillium verrucosus</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus clavatus</i>	Ocratossine
<i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium urticae</i> <i>Aspergillus clavatus</i> <i>Byssochlamys nivea</i>	Patulina
<i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium poae</i> <i>Trichothecium roseum</i>	Tricoticieni
<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Fumonisine
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Zearalenoni

Per quanto riguarda la presenza di micotossine nel latte e nei derivati lattiero caseari è più corretto parlare di *carry over* in quanto non si tratta di una contaminazione “diretta” ma di una conversione metabolica della AFB1 e B2 in AFM1 e M2 (IZS della Lombardia e dell’Emilia Romagna 2003).

### 1.1.2 AFLATOSSINE

I funghi appartenenti al genere *Aspergillus* sono in grado di produrre più di 18 tipi di micotossine diverse (figura 3), tra queste le più importanti dal punto di vista della salute umana e animale sono le aflatossine. Queste rappresentano un gruppo di metaboliti secondari prodotte da *Aspergillus flavus* (Figura 1.4) e *Aspergillus parasiticus*, in particolare il primo è responsabile della produzione solo di aflatossine di tipo B (B1, B2) con una incidenza di ceppi tossigeni del 45%, mentre il secondo produce sia aflatossine di tipo B che di tipo G, con un'incidenza di ceppi tossigeni del 92%, le aflatossine M1 e M2 rappresentano invece derivati idrossilati dalle rispettive aflatossine B1 e B2 (Cabras e Martelli 2004).



**Figura 1.4. *Aspergillus flavus* (microscopio).**

*A. flavus* e *A. parasiticus* sono molto diffusi nel terreno, nella polvere, sulle piante e sui loro frutti (Kramer 1990). Le aflatossine infatti possono formarsi sia in campo, nelle piante infette delle regioni tropicali e subtropicali, sia nelle diverse derrate stoccate in magazzino. Le piante che più si presentano a rischio per gli attacchi in campo sono il mais, l'arachide e il cotone.

Per quanto riguarda la formazione post-raccolta il contenuto minimo di umidità necessario per la crescita delle specie tossinogene è compreso tra il 9% dei semi oleosi e il 18% per il frumento, il mais e il sorgo. La

temperatura idonea alla formazione di tali tossine è compresa tra 8 e 42°C, con optimum a 25-27°C (Cabras e Martelli 2004).

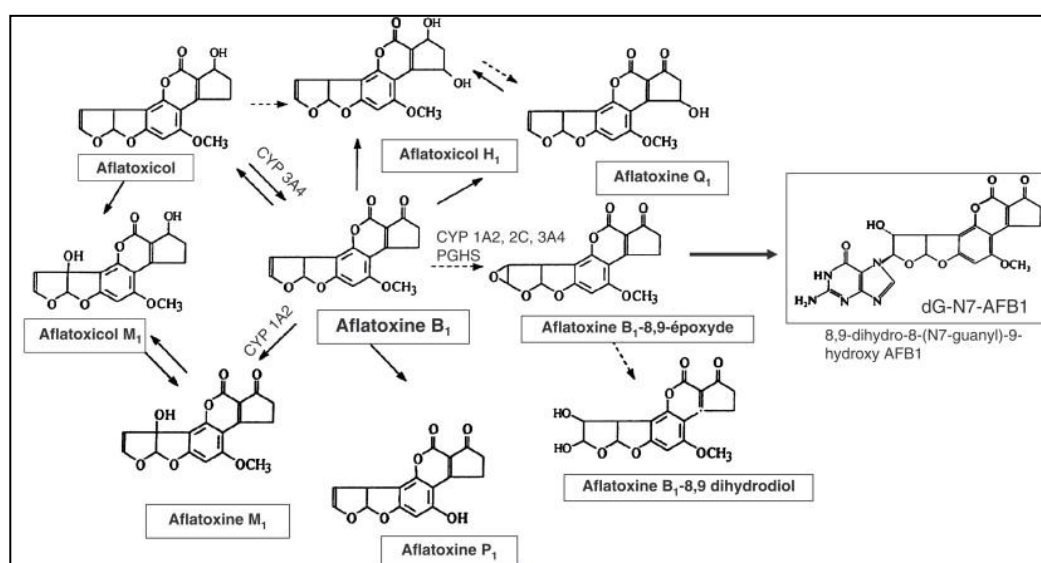
Le specie *Aspergillus* predominanti nelle regioni più calde hanno un intervallo di temperatura di crescita tra i 4°- 50° C con temperature ottimali tra i 25°-40° C, il limite di temperatura superiore raggiunge 45° C con un optimum tra i 20°-30° C (28°C) e il limite di temperatura inferiore per la formazione delle aflatossine va da 5°-12° C.

A differenza di altri generi quali *Fusarium* e *Penicillium* le cui condizioni ottimali di crescita e produzione di tossine si hanno per valori di Aw superiori a 0,95, le specie di *Aspergillus* possono dirsi relativamente resistenti all'essiccamento; infatti per *A. flavus* il limite inferiore per la crescita si ha per un valore di Aw pari a 0,78 mentre il limite inferiore di Aw per la produzione di aflatossine è compreso tra 0,82 e 0,84 circa. (Kramer 1990).

Il Ph ha un importanza sia diretta per quanto riguarda la crescita delle muffe, sia indiretta per quanto riguarda la formazione delle aflatossine; *A. flavus* e *A. parasiticus* crescono ad Ph compreso tra 2-9, intervallo nel quale si possono formare anche le aflatossine, la cui massima formazione si ha a Ph 2,5-6. Inoltre *A. flavus* può svilupparsi in presenza di piccolissime quantità di ossigeno ed in assenza di ossigeno può fermentare. Un'inibizione significativa della crescita si manifesta solo con concentrazioni di ossigeno inferiori allo 0,1%, una conservazione degli alimenti in atmosfera gassosa controllata con un contenuto in anidride carbonica CO<sub>2</sub> superiore al 20% non ha influenza sulla crescita di *A. flavus*, ma ritarda in modo significativo la produzione di aflatossina (Kramer 1990).

In considerazione delle quantità utilizzate a livello mondiale come mangime e alimento, il prodotto che riserva le più gravi ricadute economiche è il mais. Particolarmente contaminati sono anche i prodotti provenienti dalle zone tropicali dove le condizioni ambientali sono più favorevoli alla formazione delle micotossine. Dal punto di vista zootecnico l'importanza

Il latte e i prodotti lattiero caseari possono contenere aflatossine M1 e M2 (il cui nome deriva proprio dalla matrice latte “*milk*”), derivati idrossilati dell’aflatossina B1 e B2 rispettivamente (Figura 1.5), come conseguenza della conversione metabolica, ad opera del fegato, dell’aflatossina ingerita dalle bovine in lattazione alimentate con mangimi contaminati, sviluppando inoltre un’affinità per la caseina (Cattaneo *et al.* 2011).

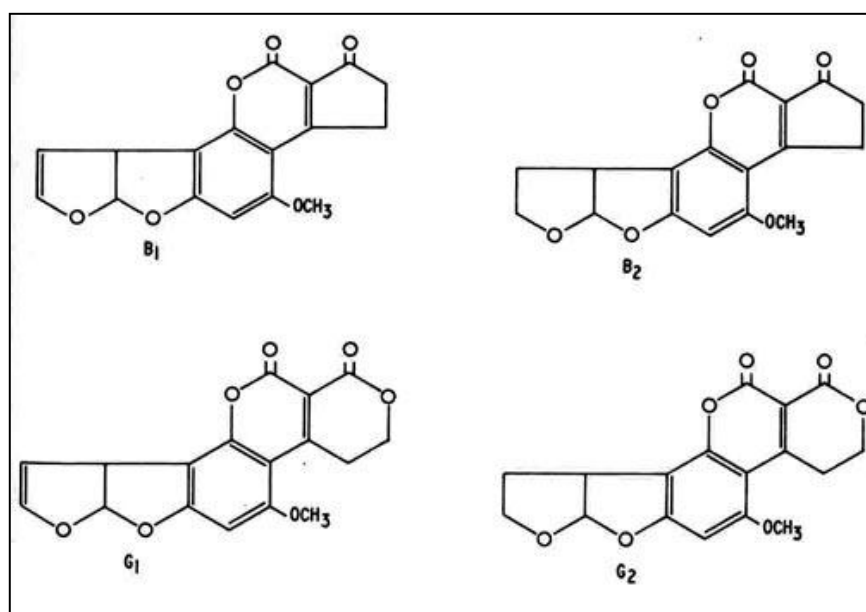


L'entità del passaggio di AFB1 ingerita dal mangime contaminato assunto dall'animale e il suo passaggio nel latte sotto forma di AFM1 varia a seconda dello stadio della lattazione (in animali ad inizio lattazione il *carry over* può essere 3-5 volte superiore rispetto ad animali a fine lattazione) ed allo stato sanitario della mammella (in presenza di mastite il *carry over* aumenta); mediamente la percentuale di passaggio è del 1-3%, con punte massime del 6,2% (IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna 2003). L'incidenza delle contaminazioni da aflatossina M1 è dell'ordine del 100% nei paesi in via di sviluppo e del 70-80% nei paesi industrializzati ed all'interno della Comunità Europea la media delle contaminazioni è molto

vicina ai limiti di tolleranza sanciti dalla legislazione (Cabras e Martelli 2004).

### Struttura chimica

Le aflatossine (AFLA) presentano una struttura eterociclica bisfuranocumarinica (Figura 1.6) che sotto luce ultravioletta (360 nm) emanano una caratteristica fluorescenza blu (*“blue”* per le aflatossine di tipo B) e verde (*“green”* per le aflatossine di tipo G), dalle quali derivano i loro nomi (figura 4).



**Figura 1.6. Struttura chimica delle aflatossine B1, B2, G1 e G2.**

Le aflatossine B2 (AFLA B1) e G2 (AFLA G2) rappresentano a loro volta i deidro-derivati delle rispettive aflatossine B1 e G1 mentre a livello epatico si forma un'altro prodotto intermedio dell'aflatossina B1, l'aflatossicolo (Cabras e Martelli 2004).

### Tossicità

Alle differenti aflatossine viene associato un grado di tossicità decrescente a partire dalla aflatossina B1 > M1 ≥ G1 > B2 > G2. L'elevatissima attività biologica e l'ampia azione tossigena delle aflatossine scaturisce dalla loro

peculiare capacità di legarsi con gli acidi nucleici e con le nucleoproteine cellulari, determinando effetti negativi ed alterazioni sulla sintesi proteica e sull'integrità della cellula stessa. In generale si può affermare che le aflatossine rappresentano dei potenti agenti epatotossici dotati di elevata genotossicità e cancerogenicità (Cabras e Martelli 2004).

Per quanto riguarda la tossicità delle aflatossine nell'uomo, si hanno solo dati indiretti derivanti da indagini condotte *in vitro* su colture cellulari o da intossicazioni inconsapevoli o accidentali. Si ritiene comunque che una concentrazione di AFLA B1 pari a 0,6-1,0 mg/Kg di alimento sia letale per l'uomo. Si ricordano a tal proposito due eventi segnalati nel 1974 in India e nel 1980 in Kenya (Bottalico 1999). In India un caso di aflatossicosi coinvolse almeno 200 villaggi con 397 pazienti e 106 decessi. Questa aflatossicosi era caratterizzata da itterizia, febbre, edema agli arti inferiori e vomito, ed è stata associata all'ingestione di mais contaminato da *A.flavus* e contenente da 6,25 a 15,6 mg/Kg di aflatossine. Si ritiene che la concentrazione soglia di aflatossina B1 nella dieta per provocare la comparsa di manifestazioni di tipo acuto nell'uomo sia dell'ordine di 0,2-12 mg/Kg. Il possibile rischio dell'uomo a tale affezione, viene valutato mediante indagini indirette attraverso le osservazioni di dati epidemiologici. Si può misurare l'esposizione dell'uomo alle aflatossine mediante la ricerca nell'urina del coniugato aflatossina B1-N7-guanina, e sia mediante la ricerca nel sangue periferico dell'addotto aflatossina B1-albumina o dell'aflatossina M1 (Bottalico 1999).

#### Tossicità nell'uomo

- Cancerogenicità: le aflatossine hanno dimostrato una potente azione cancerogena. Si sospetta un loro coinvolgimento nell'incidenza di neoplasie epatiche che vengono riscontrate più frequentemente nelle zone con maggiore presenza di alimenti contaminati. Tale supposizione è stata supportata sia da prove sierologiche effettuate su pazienti colpiti da carcinoma che da indagini epidemiologiche.



Sulla base dei dati ottenuti mediante numerose prove, lo IARC (International Agency for Research on Cancer), preposto alla valutazione delle sostanze cancerogene, ha incluso l'aflatossina B1 nel Gruppo 1 (WHO 1993), ovvero tra le sostanze sicuramente cancerogene per l'uomo (W.H.O. 2006). Per quanto riguarda invece l'aflatossina M1, che su ratto e trota dimostrano un'attività pari solo al 2-10% di quella dell'aflatossina B1, in mancanza di sufficienti prove riguardanti l'uomo, ha classificato questa tossina tra quelle del gruppo 2B (W.H.O. 2006), che comprende le sostanze cancerogene per gli animali (Bottalico 1999).

- Teratogenicità: è stato accertato che le aflatossine non solo attraversano la barriera placentare, ma sono presenti nel sangue del cordone ombelicale in concentrazioni superiori a quelle presenti nel sangue materno (Bottalico 1999).
- Mutagenicità: lo sviluppo di tumori nell'uomo è stato associato alla comparsa di mutazioni puntiformi del gene "*tumor suppressor*" (TP53) (Hussain *et al.* 2013), consistenti per lo più in una inversione di senso dei nucleotidi.
- Epatocarcinoma tossico nell'uomo: è un tipo di cancro al fegato che viene riscontrato in maggior misura nei paesi in cui la presenza delle aflatossine nella dieta risulta essere più elevata. Le indagini epidemiologiche condotte nei paesi più a rischio (Uganda, Tailandia, Kenya, Mozambico, Cina, USA e Sud-Africa), hanno infatti dimostrato una correlazione tra l'incidenza di tumore primario del fegato e l'ingestione di aflatossine per la dieta (Bottalico 1999). Il carcinoma epatocellulare (HCC) in soggetti affetti da tale patologia può predisporre a infezioni virali quali l'epatite B e C (Hussain *et al.* 2013).
- Sindrome di Reye (EFDV): si tratta di un'epatopatia cronica complessa, caratterizzata anche da encefalopatia e da degenerazione grassa dei visceri, che ricorre con particolare frequenza tra i bambini thailandesi e

malesiani. La relazione tra la EFDV e le aflatossine sono date da: distribuzione geografica e stagionalità della malattia coincidente con quella delle aflatossicosi degli allevamenti, riproduzione di sintomi simili a quelli riscontrati nella scimmia trattata con aflatossina B1 e ritrovamento di residui di aflatossina B1 sia in biopsie epatiche di bambini deceduti per EFDV, sia nell'urina di ragazzi affetti da EFDV in Thailandia, USA, ex-Cecoslovacchia e Nuova Zelanda (Bottalico 1999).

- Epatopatia infantile dell'Africa: sindrome ad eziologia complessa caratterizzata da epatiti, immunosoppressione e proteinemia, che causa la morte di migliaia di bambini nelle zone tropicali e subtropicali soprattutto africane. La presenza di aflatossina B1 e B2 in autopsie epatiche di bambini sudanesi deceduti, nonché la presenza di residui di aflatossine nel siero, nell'urina e nell'encefalo di bambini sudanesi, nigeriani o sudafricani in concentrazioni più elevate in quelle di ragazzi affetti piuttosto che in quelli sani, ha portato a far ritenere un coinvolgimento delle aflatossine in questa malattia (Peraica *et al.* 1999).

#### Tossicità negli animali

Negli '60 il Regno Unito si trova a dover affrontare quella che all'epoca venne definita "*Turkey X disease*" (*malattia X dei tacchini*), migliaia di decessi apparentemente inspiegabili di tacchini, anatre e polli; si trattava di aflatossicosi. Sin dalle prime descrizioni la patologia, nel suo decorso acuto, è caratterizzata da ittero, emorragie interne, epatocarcinomi ed elevata mortalità (Wogan *et al.* 2011). Svariate indagini sono state intraprese negli anni al fine di valutare la DL50 su diverse specie. Nell'anatroccolo di un giorno, dopo somministrazione per via orale, la DL50 è risultata rispettivamente di 0,35 mg/Kg per l'aflatossina B1, 0,4 mg/Kg per la M1, 0,79 mg/Kg per la G1, 1,2 mg/Kg per la 18 M2, 1,7 mg/Kg per la B2 e 3,5 mg/Kg per la G2. In ogni caso tutti gli animali zootecnici, pesci compresi, sono altamente sensibili all'aflatossina B1, con DL50, sempre espressa in mg/Kg che risulta di 0,4 per il coniglio, 0,62 per il maiale, 0,8 per la trota, 1,5 per la pecora, 3,5 per il tacchino e 6,3-18 per il pollastro (a

seconda della razza in esame). Anche se l'organo bersaglio delle aflatossine è il fegato, anche altri apparati e sistemi risultano essere colpiti, come quello immunitario, polmonare, gastro-intestinale, renale, nervoso e riproduttivo (Cabras e Martelli 2004).

I carcinomi a livello epatico rappresentano uno gli effetti documentati con maggiore frequenza (Dragoni *et al.* 1997). Oltre agli effetti sull'organismo animale sono da imputare alle aflatossine effetti negativi a livello economico (Cabras e Martelli 2004) dovuti principalmente al calo delle produzioni a sua volta conseguente al minor incremento ponderale dei capi zootecnici e alla riduzione della fertilità dei soggetti riproduttori. E' stato dimostrato che l'aflatossina B1, somministrata per via orale, causa la comparsa di tumori al fegato in diversi animali quali l'anatroccolo, il coniglio, la scimmia, il pulcino, il tacchino il salmone e la trota. La stessa tossina causa tumori anche ad altri organi quali la cistifellea, il colon, le ghiandole salivari, il pancreas, il polmone, il rene, il retto, lo stomaco, tessuto osseo e il tessuto sottocutaneo (Cabras e Martelli 2004).

La tossina passa attraverso il cordone ombelicale, e per questo motivo, nel ratto, somministrata durante la gravidanza, causa in via sperimentale la comparsa di carcinomi in diversi organi nella progenie. L'attività cancerogena dell'aflatossina B1 deriva dal processo di bio trasformazione della stessa tossina che, mediante l'attività del complesso enzimatico del citocromo P450, porta alla formazione di residui epatotossici, di cui almeno uno (aflatossina B1-eso-8,9-epossido), con proprietà oncogene. Tali residui avrebbero la capacità di legarsi con un legame covalente con le basi del DNA, formando così siti neoplastici bioattivi (Cabras e Martelli 2004).

### **1.1.3 FUMONISINE**

Le fumonisine (FUMO) sono un gruppo di micotossine prodotte da funghi del genere *Fusarium*, in particolare *F. proliferatum* e *F. moniliforme* (Figura 1.7). Sono presenti in tutto il mondo, in particolare nelle regioni temperate e si ritrovano principalmente nel mais, in cui causano la putrefazione del

culmo e della spiga del mais (fusariosi sistemica del mais). In particolare le fumonisine si possono riscontrare nei prodotti a base di granturco sia prima che dopo la molitura (Cabras e Martelli 2004).



**Figura 1.7. *Fusarium moniliforme* (microscopio).**

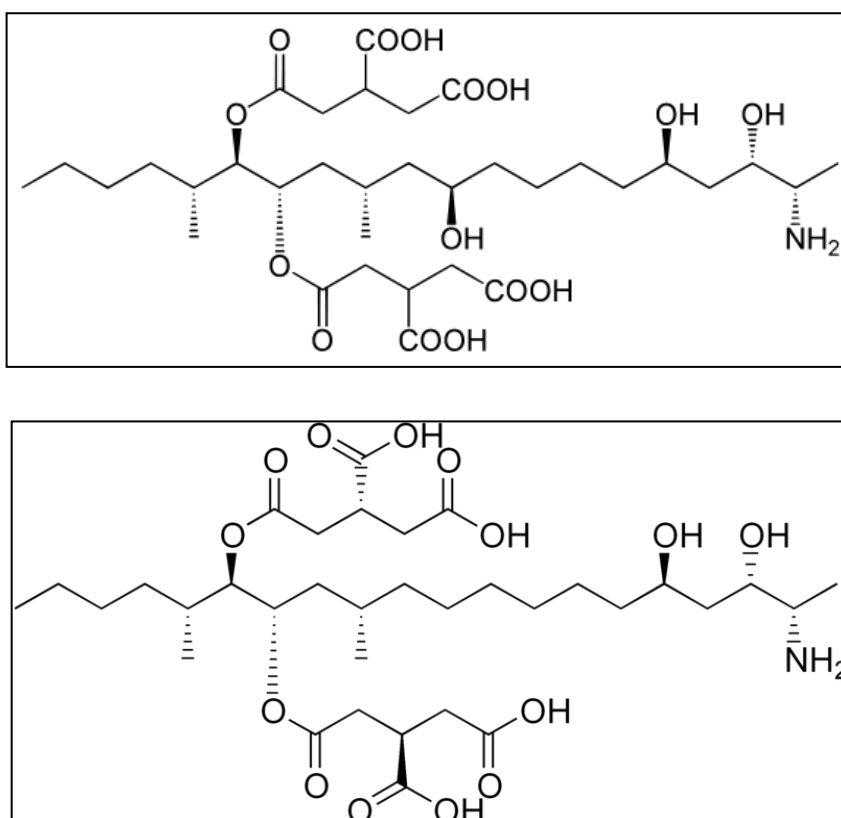
Le specie di *Fusarium* possono svilupparsi ad un intervallo di temperatura compreso tra 1-39° C con un optimum compreso tra 25-30° C (Dragoni *et al.* 1997), la temperatura ottimale per la formazione delle fumonisine è compresa tra 8-12° C (Dragoni *et al.* 1997).

I ceppi del genere *Fusarium* necessitano per proliferare di valori di attività dell'acqua molto alti, superiori ad un Aw di 0,9 e proprio per quest'ultima caratteristica la formazione delle fumonisine ha luogo generalmente in campo. La specie è in grado di infestare il mais durante la fioritura, colonizzando l'intera spiga e determinando così un accumulo di fumonisine; l'infestazione può progredire anche durante le fasi di raccolta, stoccaggio e preparazione degli alimenti, incidendo in maniera inferiore rispetto alle altre (Cabras e Martelli 2004). Inoltre è possibile ridurre la concentrazione della tossina tramite macinazione a umido, essendo la molecola molto solubile in acqua. Le fumonisine sono inoltre abbastanza sensibili al calore, pertanto la loro concentrazione può essere ridotta attraverso processi termici quali cottura ed estrusione, con temperature superiori a 150 °C (Battilani *et al.* 2008).

Attualmente si contano più di 28 tipi di fumonisine chimicamente correlate e raggruppate in sette serie (A, AK, B, BK, C, P, PH), ma tra le più comuni e pericolose si ricorda la fumonisina B1 (FB1), e con tossicità decrescente le fumonisine B2, B3 e B4 (rispettivamente FB2, FB3, FB4). In campo la FB1 rappresenta circa il 70% di quelle prodotte direttamente sui cereali, mentre la FB2 e FB3 rappresentano rispettivamente il 15-25% e il 3-8% (Cabras e Martelli 2004).

### Struttura chimica

La struttura chimica delle principali fumonisine si differenzia per il numero e la posizione dei gruppi ossidrilici che si legano allo scheletro idrocarburico (Figura 1.8). In posizione 14 e 15 della catena idrocarburica sono legati tramite legame estereo due acidi tricarballilici. I molti gruppi idrofili presenti nella molecola le conferiscono una notevole polarità.



**Figura 1.8. Struttura chimica della Fumonisin B1 (sopra) e Fumonisin B2 (sotto).**

## **Tossicità**

Fra le attività tossiche delle fumonisine vi sono l'immunotossicità, la cancerogenicità, l'epatotossicità, la nefrotossicità, la neurotossicità, la pneumotossicità e l'alterazione del bilancio lipidico. Inoltre la somiglianza della struttura chimica delle fumonisine a quella delle basi sfingoidi, sfingenina e sfingosina conferisce alle tossine la capacità di interferire con il metabolismo sfingolipidico, inibendone la biosintesi attraverso l'inattivazione enzimatica della ceramide-sintetasi e interferendo quindi con la normale struttura delle membrane cellulari (Bottalico 1999).

### Tossicità nell'uomo

Nell'uomo, le fumonisine, si ritengono coinvolte nel carcinoma dell'esofago (HEC) (Sammon 2007).

La più elevata incidenza di un tumore dell'esofago dell'uomo è stata riscontrata in alcune regioni del Sud-Africa, della Cina, degli USA e in alcune aree del nord-est Italia; è stata inoltre messa in relazione a un più largo consumo di mais. Si suppone un possibile coinvolgimento delle fumonisine in relazione al fatto che tale sintomatologia ricorre con elevata frequenza nelle stesse regioni in cui è presente un'elevata incidenza di ELEM (leucoencefalomalacia) (Marasas 2001) e coincide con le annate caratterizzate da più forti attacchi di fusariosi alle spighe. Concentrazioni elevate di fumonisina B1 si riscontrano con frequenza maggiore in mais prelevato da canali commerciali di aree dove è più incidente il cancro all'esofago dell'uomo. Tuttavia la reale responsabilità delle fumonisine nella comparsa di cancro dell'esofago resta ancora da definire (Cabras e Martelli 2004).

### Tossicità negli animali

Negli animali gli effetti della micotossina prodotta dal genere *Fusarium* sono stati osservati negli equini già lo scorso secolo, eppure la scoperta della tossicità di molecole ha origini più recenti. Intossicazioni di tipo acuto sono state registrate tra il 1901 e il 1902 negli Stati Uniti con più di 2000

cavalli deceduti a causa di una patologia sviluppata in seguito all'ingestione di cibo ammuffito. Per lo stesso motivo tra il 1934 e il 1935 ne morirono più di 5000 nello stato dell'Illinois (Voss *et al.* 2005).

Oggi la malattia è nota come “Leucoencefalomalacia” o ELEM, ed è una malattia neurologica degenerativa letale. L'ELEM è una sindrome nervosa progressiva letale, che colpisce gli equini (cavallo, asino e mulo) alimentati con mangimi a base di mais contaminato. La malattia può manifestarsi dopo pochi giorni dall'inizio del consumo della razione contaminata ed è caratterizzata da perdita di appetito, letargia e paralisi orale e facciale. L'organo più colpito è l'encefalo che mostra dei nuclei degenerativi all'interno della sostanza bianca; anche il fegato può mostrare alterazione strutturali (Marasas 2001).

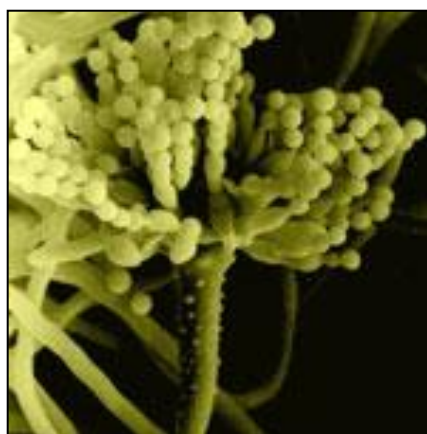
I principali sintomi della ELEM sono stati riprodotti nel cavallo mediante iniezione intravenosa di fumonisina B1. E' stata calcolata in 10 mg/Kg la soglia minima di fumonisine nella razione alimentare per la comparsa di ELEM nei cavalli (Cabras e Martelli 2004).

La fumonisina B1 ha mostrato un'elevata attività tossica anche in altre specie di interesse zootecnico quali avicoli, conigli e suini. In questi ultimi l'intossicazione si manifesta con edema polmonare (PPE) e marcato idrotorace, ma possono essere colpiti anche organi quali fegato e pancreas, caratteristica è l'elevata mortalità fetale. I sintomi principali della malattia sono stati riprodotti nel maiale somministrando fumonisina B1 sia per via orale con la dieta (48-166 mg/Kg) sia per via endovenosa (4,6-7,9 mg/Kg); è stata calcolata in 100 mg/Kg la soglia minima di fumonisine nella razione alimentare per la comparsa di PPE nel maiale (Cabras e Martelli 2004). Nei ruminanti non sembrano esserci intossicazioni di tipo acuto, probabilmente grazie alla diversità del loro apparato digerente (Nebbia *et al.* 2002).

#### 1.1.4 OCRATOSSINA

Le ocratossine sono prodotte dai generi *Aspergillus* e *Penicillium*. Le principali specie responsabili sono *A. ochraceus* (Figura 1.9), *A. clavatus*, *P. verrucosum* e altre specie minori (Dragoni *et al.* 1997); si conoscono almeno due popolazioni ocratossinogene: una diffusa nelle regioni temperate, che colonizza i cereali, mangimi e alimenti per lo più in magazzino; e l'altra nelle regioni subtropicali, che colonizza caffè e cacao specialmente in post-raccolta.

In generale le specie produttrici di ocratossina nei cereali necessitano di un contenuto minimo di umidità del 15-16% e temperature comprese tra 4-



**Figura 1.9. *Aspergillus Ochraceus* (microscopio).**

37° C. Temperature elevate (12-37 °C) favoriscono la crescita di *A. ochraceus*, mentre temperature più basse sono favorevoli per la crescita di *P. verrucosum* (4-31 °C), entrambi crescono bene su substrati non molto disidratati ( $A_w$  0,85) e pertanto sono diffusi essenzialmente nelle regioni temperate-fredde del Nord Europa e del Canada (Cabras e Martelli 2004).

Le ocratossine conosciute sono attualmente 9, tra queste, quella a cui viene attribuita la maggiore tossicità è l'ocratossina A.

La si riscontra soprattutto in materie prime cerealicole (orzo, frumento, mais, riso, sorgo, avena) e nei rispettivi prodotti industriali con prevalenza in Europa (da 0,1 a 5000 µg/kg e con un incidenza del 5-30%) rispetto ad altre zone del mondo (Cabras e Martelli 2004). Particolare attenzione



riveste la contaminazione di ocratossina A nei mangimi zootecnici dei paesi asiatici giustificando la comparsa di nefropatie negli allevamenti; Altri importanti prodotti che stanno suscitando interesse sono le uve e il vino di paesi quali Marocco, Giappone, Australia.

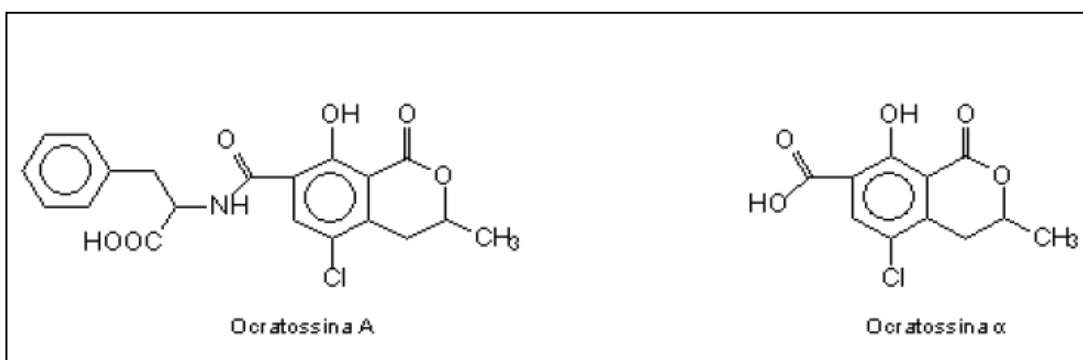
Inoltre talvolta lo sviluppo di ocratossina A può avvenire durante la conservazione o la commercializzazione stessa di prodotti, quando per qualche motivo essi tendono a riacquistare umidità (Cabras e Martelli 2004).

I trattamenti classici di sterilizzazione degli alimenti permettono di distruggere le forme vegetative dei miceti, ma sono per lo più poco efficaci contro le ocratossine, che sono termostabili come la gran parte delle micotossine.

La conoscenza dei livelli di contaminazione dei cereali è molto importante per formulare delle linee guida circa i rischi di contaminazione dei cereali stessi e delle derrate che potrebbero derivare da animali alimentati con mangimi contaminati. Questo aspetto è determinante poiché le derrate alimentari ingerite dall'uomo possono provocare intossicazioni sia di tipo acuto che di tipo cronico. Infatti l'ocratossina ingerita dall'animale, viene assorbita a livello gastrico e finisce nel sangue dove persiste per molto tempo, andando ad accumularsi negli organi predisposti alla detossificazione e all'escrezione. La micotossina può quindi concentrarsi in prodotti come uova, carne e latte. E' importante ricordare la sua presenza anche in carni e insaccati di origine suina. L'uomo può quindi venire a contatto con la tossina sia per via diretta, ingerendo cereali e prodotti contaminati direttamente dalla specie fungina produttrice, sia per via indiretta, attraverso l'ingestione di alimenti provenienti da animali alimentati con mangimi contaminati (Battacone *et al.* 2010).

## Struttura chimica

Tre le 9 ocratossine conosciute, il composto dal punto di vista tossico più importante è l'ocratossina A (Cabras e Martelli 2004). La struttura dell'ocratossina A è caratterizzata da un residuo di fenilalaninico legato tramite un gruppo ammidico ad un residuo cumarinico, la presenza di gruppi ossidrilici rende la molecola polare e solubile in solventi organici (Smith e Henderson 1991).



**Figura 1.10. Struttura chimica dell'ocratossina A e del suo derivato, l'ocratossina B.**

A livello ruminale, in seguito a idrolisi acida operata dalla flora batterica, l'ocratossina A è responsabile della formazione di una fenilalanina e di un residuo lattonico non tossico, noto come ocratossina  $\alpha$  (Smith e Henderson 1991).

L'ocratossina B rappresenta il derivato decolorinato dell'ocratossina A, risulta essere meno tossica del suo precursore e non presenta alcun potere nefrotossico (Figura 1.10).

L'ocratossina A svolge prevalentemente un'azione nefrotossica, tuttavia in funzione alla dose di assunzione e alla specie di destinazione può esplicare anche azione immunotossica, cancerogena, genotossica; a concentrazioni massicce (5-10 ppm) può dare epatotossicità, può causare enteriti e necrosi del tessuto linfatico (Cabras e Martelli 2004).

L'inibizione della sintesi proteica e i conseguenti danni a carico del DNA incidono maggiormente a livello delle cellule renali, in parte a livello delle cellule epatiche e in maniera minima sul sistema immunitario. I monogastrici inoltre rappresentano i soggetti più sensibili a tale

micotossicosi rispetto ai poligastrici nei quali l'ocratossina A viene convertita a livello ruminale nel suo metabolita non tossico (ocratossina  $\alpha$ ).

### Tossicità nell'uomo

per quanto riguarda le intossicazioni con decorso acuto nell'uomo, i dati a disposizione non sono molti, l'assunzione di tale tossina infatti avviene prevalentemente per via accidentale o inconsapevole, tuttavia in virtù dell'alto grado di affinità tra l'ocratossina A e le siero-albumine si può affermare che elevate dosi della tossina nell'alimento determinino il suo rapido trasporto a livello degli organi bersaglio, provocando tossicità di tipo acuto (Poora *et al.* 2012). Questo spiegherebbe la relazione tra questa micotossina e l'insorgenza di nefropatie umane di tipo acuto nei paesi più esposti al rischio di alimenti contaminati (Cabras e Martelli 2004).

Uno dei maggiori effetti da attribuire all'ocratossina A è sicuramente riconducibile all'inibizione della sintesi di proteine, ma non meno importanti sono l'inibizione della perossidasi lipidica e gli spiccati danni a carico del DNA, al quale si legano facilmente i metaboliti dell'ocratossina A, causandone la rottura della doppia elica. Sono inoltre riportati in letteratura effetti mutageni in cellule mammarie, dovuti alla formazione di radicali, prodotti dall'alterazione della perossidasi lipidica, che vanno ad alterare come precedentemente accennato la struttura del DNA (Cabras e Martelli 2004).

- Nefropatia endemica balcanica (BEN): è una malattia renale dell'uomo segnalata fin dai primi anni '50 del secolo scorso nell'area dei Balcani comprendente ex- Jugoslavia, Bulgaria e Romania. La coincidenza geografica tra questa nefropatia e quella micotossica dei suini, unitamente alle analogie sintomatologiche e alla maggior presenza di ocratossina A nella dieta delle popolazioni più colpite, hanno fatto ritenere che alla base di queste due malattie ci potesse essere un comune fattore eziologico. Ulteriori conferme a questa ipotesi sono state ottenute con il riscontro di una più elevata presenza di ocratossina A nel sangue (2-50 ng/ml) di pazienti di

un'area della Croazia caratterizzata da un'elevata incidenza della malattia (Cabras e Martelli 2004).

La malattia in questione colpisce il tratto del tubulo interstiziale del rene, ed è caratterizzata da un lento decorso che si conclude con la perdita della funzionalità renale (Wu *et al.* 2011). La malattia compare nei primi cinquant'anni di vita, procede lentamente e in maniera asintomatica; i pazienti pertanto, nonostante il danno tubolare, presentano flusso urinario e filtrazione glomerulare normali. Caratteristica di questa patologia è la presenza di anemia che compare fin dai primi stadi. I reni si presentano con margini assottigliati, ridotti di peso e con fibrosi corticale diffusa (Wu *et al.* 2011).

#### Tossicità negli animali

L'ocratossina A è una micotossina nefrotossica dotata di elevata tossicità acuta. La DL50 per via orale, per i diversi animali, varia da 0,2 a 50 mg/Kg di peso corporeo. Gli animali più sensibili sono il cane (DL50 0,2 mg/Kg) e il maiale (DL50 1,0 mg/Kg). Seguono il pulcino (DL50 3,4 mg/Kg) e il ratto (DL50 21,4 mg/Kg per la femmina e 22-30,3 mg/Kg per il maschio). Può quindi provocare ad alte dosi (5-10 ppm) la comparsa di epatiti, enteriti e necrosi del tessuto linfatico (Cabras e Martelli 2004). Le principali conseguenze tossiche sono:

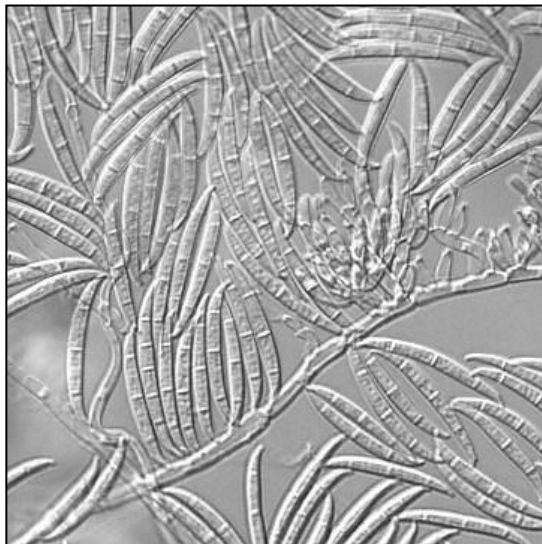
- Cancerogenicità: prove condotte su animali da laboratorio indicano che diete contenenti ocratossina A (20-25 mg/Kg) sono in grado di indurre la comparsa di adenomi e di carcinomi renali sia nel topo (100% nei maschi) che nel ratto, ed aumentare l'incidenza di tumori epatici nel topo. Sulla base di questi risultati, l'ocratossina A è stata classificata dalla Commissione di esperti IARC come possibile cancerogeno per l'uomo ed inclusa tra le sostanze del gruppo 2B (Cabras e Martelli 2004) (W.H.O. 2006).

- Teratogenicità: le diverse prove effettuate su animali da laboratorio dimostrano che l'ocratossina A possiede un'attività embriotossica, fetotossica e teratogena, mentre risulta irrilevante l'attività mutagena. Somministrata a topo, ratto, pulcino, criceto e scimmia nel corso della prima fase di gestazione, l'ocratossina A causa fetotossicità, mortalità nella progenie e malformazioni scheletriche. La stessa tossina è in grado di provocare effetti teratogeni anche su embrioni di pollo (Cabras e Martelli 2004).
- Nefropatia micotossica dei suini: è una patologia descritta per la prima volta in Danimarca e successivamente in Norvegia, Svezia, Irlanda, Ungheria, ex- Jugoslavia, Canada e Usa. La malattia colpisce essenzialmente i suini ed è associata al consumo di cereali, in particolare di frumento e orzo. È caratterizzata da degenerazione dei tubuli prossimali, seguita da atrofia dell'epitelio tubolare e da fibrosi interstiziale della corticale. Tra le altre manifestazioni vi sono danni epatici, ritardi nell'accrescimento e nella maturazione dei giovani animali e ancora gastroenteriti (Wu *et al.* 2011).
- Nefropatia micotossica aviaria: è ricorrente in Canada e USA e colpisce diverse specie aviarie con particolarità per la gallina e il tacchino. La malattia è associata al consumo di mais contaminato e si manifesta su entrambe le specie con una riduzione delle produzioni: calo dell'ovodeposizione, nefriti ed elevata mortalità (Wu *et al.* 2011).

### **1.1.5 TRICOTECENI (DEOSSINIVALENOLO)**

I tricoteceni sono tossine prodotte da diversi generi di funghi *Fusarium* e *Trichithecium*, rappresentano sono un'ampia famiglia di circa 150 composti naturali strutturalmente correlati tra loro e dotati di una analoga attività biologica. (Cabras e Martelli 2004).

All'interno di questo gruppo sono state individuate due tipologie di tricoteceni, A e B, distinti in base al gruppo funzionale legato al carbonio in posizione 8 (Figura 1.11).



**Figura 1.11. *Fusarium graminearum* (microscopio).**

**Tricoteceni di tipo A**, sono caratterizzate dalla presenza di un gruppo funzionale in posizione C-8 diverso da un chetone:

- tossina T-2 e suoi derivati HT-2, T-2 tetraol;
- diacetossiscirpenolo (anguidina) e monoacetossiscirpenolo;
- neosolaniolo.

**Tricoteceni di tipo B**, sono caratterizzate dalla presenza di un gruppo carbonilico in posizione C-8:

- deossinivalenolo (vomitossina) e i suoi derivati monoacetilati e diacetilati;
- nivalenolo e i suoi derivati monoacetilati (fusarenone) e diacetilati.

Il Deossinivalenolo (DON), è una tossina prodotta da alcune specie del genere *Fusarium*, e in particolare da *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. cerealis*. La formazione della tossina è facilmente riscontrabile in piantagioni cerealicole delle regioni temperate centro-meridionali. La

crescita dei funghi produttori può iniziare in campo qualora le condizioni ambientali siano favorevoli con temperature comprese tra 18-25°C e umidità del 20-22%. Con tali condizioni i ceppi tossigeni appartenenti al genere *Fusarium* sopra indicati iniziano la produzione di tossine, produzione che può continuare anche dopo la raccolta delle piante contaminate e durante il periodo di stoccaggio in magazzino. Tra i cereali più colpiti si può ricordare il mais, il frumento, il sorgo, l'orzo e l'avena. Non meno probabile è la contaminazione anche di granaglie, insilati e fieno, purché le condizioni ambientali rimangano quelle sopradescritte.

Il DON è probabilmente la “fusariotossina” più largamente diffusa e le segnalazioni della sua presenza sia nelle culture cerealicole infette, nelle cariossidi immagazzinate, nei mangimi e negli alimenti. Nelle annate di gravi contaminazioni nelle spighe di cereali si possono riscontrare frequentemente presenze di deossinivalenolo fino a 9 ppm nell'orzo e fino a 6 ppm nel frumento. Di particolare rilievo sono i ritrovamenti quasi costanti di questa tossina nei cereali in commercio (frumento, orzo, avena, triticale, segale, mais, sorgo e riso), con incidenze medie superiori al 70% e presenze che variano 0,01-49,6 mg/Kg in Asia, 0,02-10 mg/Kg in Canada e USA, 0,25-9,25 mg/Kg in Argentina e 0,02-5,0 mg/Kg in Europa (Bottalico 1999).

Il DON è molto resistente al calore e si ritrova quasi inalterato nei prodotti da forno quali pane, merendine, semolini, biscotti, cracker, cereali per la colazione, popcorn e fette biscottate, come dimostrano i monitoraggi effettuati in Argentina (93% di prodotti contaminati con concentrazioni di 0,2-2,8 ppm) e in USA e Canada (50% di prodotti contaminati con concentrazioni di 0-0,18 ppm). Nei mangimi il deossinivalenolo può trovarsi in concentrazioni fino a 15 ppm, concentrazioni che giustificano la frequente comparsa di sindrome emetica negli allevamenti zootecnici, soprattutto di maiali, nelle zone maggiormente colpite dalla presenza della tossina (Cabras e Martelli 2004).

## Struttura chimica

Il deossinivalenolo è caratterizzato da un doppio legame tra gli atomi di carbonio C-9 e C-10 della sua molecola, e dalla presenza di un anello epossidico in posizione C-12 e C-13: si differenzia dalle altre molecole appartenenti al gruppo dei tricoteceni per la presenza di un gruppo carbonilico in posizione C-8 (Figura 1.12), che ne permette la differenziazione rispetto alle altre tossine della famiglia.

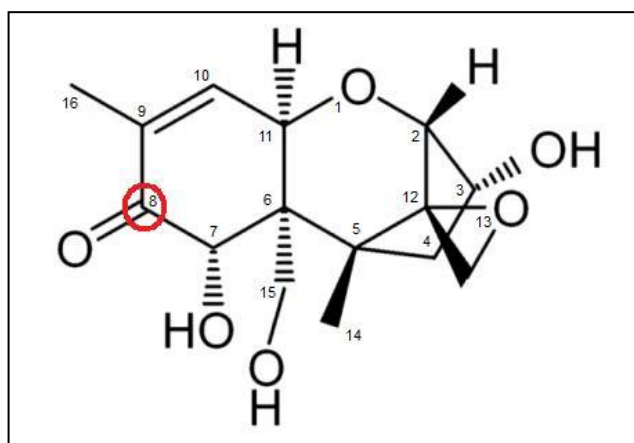


Figura 1.12. Struttura chimica del deossinivalenolo.

## Tossicità nell'uomo

Vi sono alcune segnalazioni in letteratura di intossicazioni acute causate da tricoteceni del gruppo B, avvenute in Cina, India e Giappone; in tali intossicazioni la malattia si è manifestata con nausea, vomito, dolori addominali, irritazioni alla gola e diarrea emorragica. Le intossicazioni sono state associate all'ingestione di cereali ammuffiti contenenti deossinivalenolo da solo o in combinazione con nivalenolo, zeralenone e tossina T-2 (Cabras e Martelli 2004).

L'attività immunosoppressiva del deossinivalenolo potrebbe essere alla base di una patologia umana conosciuta come "Glomerulonefropatia dell'uomo", a supporto di tale tesi sono presenti però soltanto prove di laboratorio condotte su topi e non ci sono prove dirette sull'uomo (Cabras e Martelli 2004); le ipotesi si basano sulla similitudine tra i danni provocati dalla tossina nel topo e gli stessi sintomi anatomico-patologici riscontrati nell'uomo (Kouadio *et al.* 2013).



### Tossicità negli animali

Il deossinivalenolo è una molecola che presenta bassa tossicità acuta, e la sua DL50 per via orale nel topo è di 46 mg/Kg. La specie zootecnica più sensibile risulta essere il suino e nelle prove di tossicità acuta condotta su magroni, dosi giornaliere di 1,3-2 mg/Kg di peso corporeo hanno portato, a partire dalle 24 ore successive alla somministrazione, a manifestazioni di intensità crescente di vomito, diarrea, astenia, tremori e coma. In analoghe prove di tossicità, sono state calcolate dosi di 5-38 mg/Kg per il pollo, 6 mg/Kg per il bovino e dosi maggiori ai 15 mg/Kg per l'agnello. Per quanto riguarda invece la dose minima a cui compaiono i primi sintomi nel suino, sono state calcolate dosi pari a 50-100 µg/Kg di peso vivo, ovvero circa 1-5 mg/Kg di razione alimentare. Da quanto detto emerge come il DON abbia un'elevatissima attività emetica (10 volte superiore a quella della tossina T-2) (Cabras e Martelli 2004), ma un'attività letale molto ridotta (10 volte inferiore a quella della tossina T-2) (Kouadio *et al.* 2013).

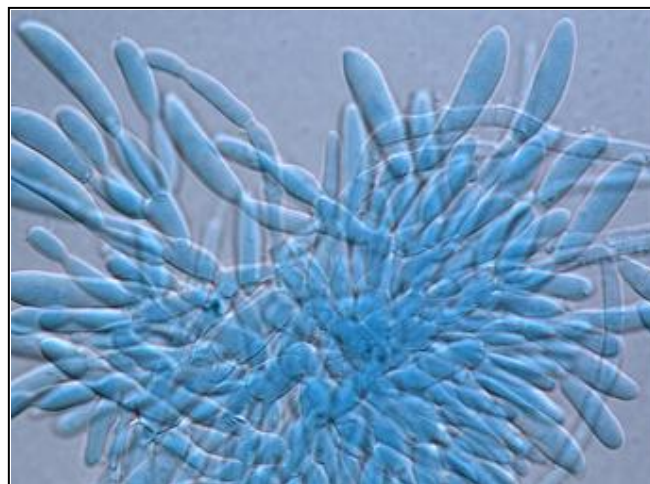
Il DON inibisce sia la sintesi proteica che la sintesi degli acidi nucleici. A differenza degli altri tricoteceni, che sono attivi nelle fasi iniziali della sintesi proteica, questa tossina interferisce sull'allungamento terminale della catena proteica.

Il DON è dotato inoltre di elevata attività immunosoppressiva che si manifesta sia come inibizione della proliferazione linfocitaria, sia come squilibri del rapporto tra IgG e IgA a favore di quest'ultima. Le prove di laboratorio portano inoltre ad escludere la possibilità che il deossinivalenolo possa avere capacità cancerogena. Per questo motivo la Commissione IARC ha incluso il DON tra le sostanze non cancerogene del Gruppo 3 (W.H.O. 2006).

### **1.1.6 ZEARELENONI**

Gli zearalenoni sono prodotti da diverse specie di *Fusarium*, ed in particolare da *F. graminearum*, *F. culmorum* (Figura 1.13), *F. equiseti*, *F. cerealis* e *F. heterosporum*. Tra i prodotti più soggetti a contaminazione da

zeralenone vi sono essenzialmente i cereali (cariossidi, sfarinati, mangimi, alimenti) ed in modo particolare il mais (cariossidi, semola, fiocchi, malto, birra), nonché foraggi e fieni (Cabras e Martelli 2004).



**Figura 1.13. *Fusarium culmorum* (microscopio).**

La produzione di sostanze tossiche da parte dei funghi produttori di ZEA può avere inizio sulle culture infette (mais, frumento, sorgo, orzo, avena e segale) e continuare durante la raccolta e nelle fasi di stoccaggio (granaglie, insilati e fieni) se le condizioni restano favorevoli. Risultano indispensabili condizioni di umidità superiori al 20-22% e un'alternanza di temperature diurne di 22-25°C che assicurano la crescita del fungo, e notturne di 12-15°C che stimolano la sintesi della tossina. Lo ZEA può essere prodotto dagli stessi funghi produttori dei tricoteceni di tipo B e pertanto non è raro ritrovarlo in associazione con tali micotossine con conseguente accumulo di metaboliti tossici anche in mais ad uso zootecnico. La presenza di ZEA negli alimenti cerealicoli solitamente non supera la soglia limite per la comparsa di segni di iperestrogenismo tipici di tale micotossinfezione, tuttavia non è raro trovare in Europa livelli superiori al limite soglia (Cabras e Martelli 2004).

### Struttura chimica

Il composto che tra i 12 zearalenoni naturali riveste maggiore importanza micotossicologica è lo zearalenone (ZEA), noto anche come F-2, RAL (lattone dell'acido resorcilico) o FES (sostanza estrogena di fermentazione) (Figura 1.14).

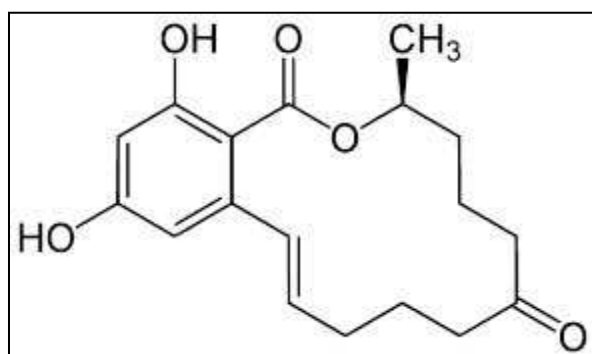


Figura 1.14. Struttura chimica dello zearalenone.

Nelle colture del fungo e nelle derrate contaminate dallo ZEA spesso si ritrova anche un suo metabolita lo zearalenolo; delle due forme isomeriche,  $\alpha$  zearalenolo e  $\beta$  zearalenolo, è più frequente reperire la miscela diastomerica piuttosto che la singola forma  $\alpha$ .

L'  $\alpha$  zearalenolo inoltre può anche essere prodotto sinteticamente e negli Stati Uniti d'America in cui vige un sistema legislativo differente da quello Europeo, esso è autorizzato dalla Food and Drug Administration quale fattore anabolico per incrementare la crescita dei vitelli da latte, dei vitelloni e degli agnelli (Cabras e Martelli 2004).

### Tossicità nell'uomo

Lo zearalenone è una sostanza dotata di attività anabolica ed utero trofica che, se presente nella dieta a basse concentrazioni, è in grado di esaltare alcune attività metaboliche fisiologiche comportandosi come un ormone estrogenico non steroideo (Kang *et al.* 2013) alterandone la normale funzionalità di alcuni organi.

Non avendo quindi un decorso acuto, è difficile collegare l'ingestione accidentale della tossina ad una precisa sintomatologia. In bibliografia sono presenti segnalazioni di manifestazioni, anche in forma epidemica, di precocità sessuale e precocità pre-puburale nei giovani di 7-8 anni (Porto Rico e Ungheria) (Cabras e Martelli 2004).

#### Tossicità negli animali

Nei suini concentrazioni di 1 mg/Kg sono sufficienti per causare la comparsa dei primi segni di iperestrogenismo nelle scrofette e di femminizzazione nei magroni (Kovalsky *et al.* 2014). Lo zeralenone non è dotato di tossicità acuta e saggi di DL50 con singole dosi orali fino a 20 g/Kg nel topo e nel ratto e di 15 g/Kg nel pulcino hanno dato esito negativo. Altre prove dimostrano invece l'importante attività anabolica della molecola su entrambi i sessi delle specie appena menzionate, unitamente a uterotrofia e iperestrogenismo nelle femmine, specialmente se impubere, ed attenuazione della virilità nei maschi. L'  $\alpha$  zearalenolo rappresenta l'isomero tre volte più attivo rispetto al suo precursore, lo zearanelone, mentre il  $\beta$  zearalenolo è circa tre volte meno attivo dello zearanelone. La specie più sensibile allo zearanelone è il suino che manifesta sintomi quali pseudogavidanza, associata a disfunzioni nei cicli estrali, già a concentrazioni di tossina nella dieta di 0,5 mg/Kg (Cabras e Martelli 2004). Oltre a tali effetti le scrofe possono presentare vulvo-vaginite ed iperestrogenismo, mentre i verri manifestano attenuazione delle caratteristiche sessuali maschili e femminizzazione. Tra le altre specie sensibili vi sono la specie bovina, le specie aviarie, la specie ovina e diversi animali da laboratorio.

Effetti di tossicità cronica indotta sperimentalmente con somministrazione di basse concentrazioni (100% e 150% NOAEL *Non Observed Adverse Effect Level* = 50 e 75  $\mu$ g/Kg) di zeralenone hanno determinato alterazione dell'omeostasi dell'ormone estradiolo e del progesterone con conseguente alterazione nella maturazione sessuale, accrescimento somatico e peso corporeo in cagne (Gajecka *et al.* 2013).

La Commissione IARC, in mancanza di adeguati dati di cancerogenicità sia sugli animali che sull'uomo, ha incluso lo zearalenone Gruppo 3 insieme agli *agenti non classificabili in base alla cancerogenicità per l'uomo* (W.H.O. 2006).

## **1.2 PREVENZIONE E PROSPETTIVE DI CONTROLLO**

Dopo quanto detto nelle pagine precedenti è chiaro come il settore agroalimentare (agricoltura, industria alimentare e industria mangimistica) siano fortemente sensibili all'argomento "micotossine", sia dal punto di vista della salute che dal punto di vista economico.

Pertanto sono stati messi in atto degli interventi per fronteggiare la contaminazione fungina e la formazione di micotossine sia nelle colture e nei prodotti agricoli in pre-raccolta, post-raccolta, trasporto, stoccaggio, che nei mangimi e negli alimenti durante le loro fasi di trasformazione.

La lotta contro la contaminazione di micotossine può avvenire mediante interventi preventivi, curativi, legislativi e sanitari.

La prevenzione rappresenta una delle prime misure di controllo e si assicura di evitare l'instaurarsi di condizioni favorevoli alla crescita delle muffe; tra i mezzi di prevenzione in pre-raccolta vi sono:

- impiego di varietà resistenti al fungo e/o inadatte alla sintesi di micotossine;
- adozione di pratiche agronomiche volte ad evitare condizioni di stress per le colture;
- rapido essiccamento delle colture al momento della raccolta fino a ridurre il contenuto di umidità a livelli incompatibili con la crescita dei funghi.

Tra i mezzi preventivi in post-raccolta vi sono:

- disinfezione e disinfestazione delle colture;

- mantenimento del grado di essiccamento delle derrate durante stoccaggio e trasporto;
- stoccaggio a basse temperature;
- stoccaggio in atmosfera controllata.

Tra i mezzi di lotta preventiva e curativi nel corso delle preparazioni alimentari (alimenti e mangimi) vi sono:

- igiene ambientale;
- impiego di ceppi non tossigeni nelle biotecnologie di alcuni alimenti;
- impiego di preservanti.
- decontaminazione fisica (manuale, meccanica, elettroniche), chimica (solventi organici);
- detossificazione fisica (termica), chimica (perossido di idrogeno, ammoniaca, idrossido di calcio, aldeide formica, etere metilico, miscele di metilammina e idrossido di calcio), biologica (fermentazioni);
- declassamento delle derrate contaminate a mangime, facendo affidamento alla detossificazione metabolica operata da alcune specie zootecniche (Dragoni *et al.* 1997) purché i livelli di contaminazione siano congrui alla normativa vigente (Reg CE 574/2011).

Esistono poi interventi di tipo legislativo volti a tutelare la salute dell'uomo e degli animali mediante l'utilizzo di livelli di tolleranza e limiti massimi di ciascun contaminante nei diversi prodotti ed in funzione della specie di destinazione (vedi paragrafo successivo).

Infine esistono interventi che possono essere applicati all'interno dell'industria alimentare, nei laboratori di produzione che prevedono controlli microbiologici preliminari, filtrazione dell'aria e sistemi di condizionamento, separazione dei locali di stoccaggio delle materie prime,

misure di igiene ambientale (mezzi chimici e/o fisici) mirate anche alla tipologia di prodotto alimentare (Dragoni *et al.* 1997).

Tuttavia per quanto riguarda gli alimenti contaminanti contenuti all'interno del Reg. CE 1881/2006 valgono le indicazioni dell'articolo 3 in materia di uso, miscelazione e detossificazione.

I processi di macinazione e di cottura nella trasformazione degli alimenti hanno dimostrato di ridurre significativamente il contenuto di aflatossine. Nel mais riscaldamento e torrefazione riducono in modo significativo i livelli di aflatossine (Mohamed e Zain 2010) Argille, bentonite e alluminosilicato riducono l'intossicazione di aflatossine nei suini, bovini, ratti e pollame senza causare problemi digestivi se miscelati nel mangime (Scheideler 1993), tuttavia queste argille risultano inefficaci contro zearalenone e fumonisine e possono inoltre alterare il valore nutrizionale della dieta, riducendo la biodisponibilità di minerali e vitamine (Devegowda e Castaldo 2000).

L'utilizzo di cereali, loro sottoprodotti, e miscele di materie prime nella formulazione di mangimi per animali da compagnia possono rappresentare un rischio elevato dovuto alla somma delle contaminazioni e contenere livelli concentrati di micotossine (Leung *et al.* 2006).

### **1.3      LEGISLAZIONE**

Il problema delle micotossine riscontrate in alimenti, specialmente in prodotti agricoli come i cereali, rappresenta un tema molto sentito a livello mondiale, al punto da suscitare l'attenzione dei legislatori che hanno ritenuto, per motivi sanitari, di regolamentare la presenza di queste sostanze stabilendo dei limiti massimi tollerabili per categoria di alimento/materia prima destinata alle diverse specie animali e all'uomo.

L'emanazione di tali limiti (Reg. CE 1881/2006), comuni tra tutti gli Stati Membri dell'Unione Europea, è stata necessaria per garantire un elevato livello di sicurezza negli alimenti e nei mangimi ed un'uniformità di mercato

in materia di contaminazione da micotossine. Nel definire i limiti massimi residuali di questi contaminanti (nelle Tabelle 1.4, 1.5, 1.6, 1.7 e 1.8 sono riportati i limiti relativi alle micotossine oggetto del presente studio in alcuni prodotti alimentari) si sono presi in considerazione diversi aspetti: rischi scaturiti dall'ingestione, linee guida sull'applicazione di buone pratiche riguardanti tutte le fasi della produzione agroalimentare con particolare attenzione alla coltivazione, alle tecniche di lavorazione e di conservazione.

2.1.6	Tutti i cereali e loro prodotti derivati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.1.7, 2.1.10 e 2.1.12	2,0	4,0	—
2.1.7	Granturco da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0	10,0	—
2.1.8	Latte crudo <sup>(6)</sup> , latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte	—	—	0,050

**Tabella 1.4. AFLATOSSINE, tenori massimi (µg/kg) di B1, B1+B2+G1+G2 e M1, Reg. CE 1881/2006.**

2.2.1	Cereali non trasformati	5,0
2.2.2	Tutti i prodotti derivati dai cereali non trasformati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali e i cereali destinati al consumo umano diretto, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.2.9 e 2.2.10	3,0

**Tabella 1.5. OCRATOSSINA. tenori massimi (µg/kg) Reg. CE 1881/2006.**



2.4.1	Cereali non trasformati <sup>(18)</sup> <sup>(19)</sup> diversi da grano duro, avena e granturco	1 250
2.4.2	Grano duro e avena non trasformati <sup>(18)</sup> <sup>(19)</sup>	1 750
2.4.3	Granturco non trasformato <sup>(18)</sup>	1 750 <sup>(20)</sup>
2.4.4	Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali [compresa la farina di granturco, la semola di granturco e il granturco grits <sup>(21)</sup> ], crusca come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto e germe, eccetto i prodotti alimentari di cui al punto 2.4.7	750
2.4.5	Pasta (secca) <sup>(22)</sup>	750
2.4.6	Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione	500

**Tabella 1.6. DEOSSINIVALENOLO. Tenori massimi (µg/kg) Reg. CE 1881/2006.**

2.5.1	Cereali non trasformati <sup>(18)</sup> <sup>(19)</sup> diversi dal granturco	100
2.5.2	Granturco non trasformato <sup>(18)</sup>	200 <sup>(20)</sup>
2.5.3	Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto e germe, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.5.4, 2.5.7 e 2.5.8	75
2.5.4	Granturco destinato al consumo umano diretto, farina di granturco, semola di granturco, granturco grits, germe di granturco e olio di mais raffinato <sup>(21)</sup>	200 <sup>(20)</sup>
2.5.5	Pane (compresi i piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione, esclusi le merende a base di granturco e i cereali da colazione a base di granturco	50
2.5.6	Merende a base di granturco e cereali da colazione a base di granturco	50 <sup>(20)</sup>

**Tabella 1.7. ZEARALENONE. Tenori massimi (µg/kg) Reg. CE 1881/2006.**

2.6.1	Granturco non trasformato <sup>(18)</sup>	2 000 <sup>(23)</sup>
2.6.2	Farina di granturco, semola di granturco, granturco grits, germe di granturco e olio di mais raffinato <sup>(21)</sup>	1 000 <sup>(23)</sup>
2.6.3	Alimenti a base di granturco destinati al consumo umano diretto, eccetto gli alimenti di cui ai punti 2.6.2 e 2.6.4	400 <sup>(23)</sup>

**Tabella 1.8. FUMONISINE. Tenori massimi (µg/kg) Reg. CE 1881/2006.**

Nel 2006 la Commissione Europea ha emanato la Raccomandazione n. 583 che fissa i principi riguardanti la prevenzione, il controllo e la diminuzione della contaminazione da alcune micotossine del genere *Fusarium*. Per quanto riguarda invece gli alimenti destinati al consumo animale (zootecnico e non) la Raccomandazione CE 576/2006 suggerisce i limiti per deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, T-2, HT-2 e fumonisine B1 e B2 (Tabella 1.9).

VALORI DI RIFERIMENTO		
Micotossina	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Valore di riferimento in mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12 %
Desossinivalenolo	Materie prime per mangimi (*)	
	— Cereali e prodotti a base di cereali (**) fatta eccezione per sottoprodotti del granoturco	8
	— Sottoprodotti del granoturco	12
	Mangimi complementari e completi, ad eccezione di:	5
	— mangimi complementari e completi per suini,	0,9
	— mangimi complementari e completi per vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti	2
Zearalenone	Materie prime per mangimi (*)	
	— Cereali e prodotti a base di cereali (**) fatta eccezione per sottoprodotti del granoturco	2
	— Sottoprodotti del granoturco	3
	Mangimi complementari e completi	
	— Mangimi complementari e completi per suinetti e scrofette (giovani scrofe)	0,1
	— Mangimi complementari e completi per scrofe e suini da ingrasso	0,25
Ocratossina A	— Mangimi complementari e completi per vitelli, bovini da latte, ovini (inclusi agnelli) e caprini (inclusi capretti)	0,5
	Materie prime per mangimi (*)	
	— Cereali e prodotti a base di cereali (**) fatta eccezione per sottoprodotti del granoturco	0,25
	Mangimi complementari e completi	
	— Mangimi complementari e completi per suini	0,05
	— Mangimi complementari e completi per pollame	0,1
Fumonisine B1 + B2	Materie prime per mangimi (*)	
	— Granoturco e prodotti derivati (***)	60
	Mangimi complementari e completi per:	
	— suini, equini ( <i>Equidi</i> ), conigli e animali da compagnia,	5
	— pesci,	10
	— pollame, vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti,	20
	— ruminanti adulti (> 4 mesi) e visoni	50

**Tabella 1.9. Raccomandazione CE 576/2006.**

Va notato come, nonostante la diffusione delle tipologie cerealicole implicate nella contaminazione da micotossine, l'unico suggerimento della Raccomandazione 567/2006 per quanto riguarda i mangimi complementari e completi per animali da compagnia sia riferito solo alle fumonisine (somma di FB1 + FB2).

Nel 2011 è stato emanato il Regolamento CE 574 che fissa i limiti massimi tollerabili di aflatossina B<sub>1</sub> nei mangimi (Tabella 1.10).

Sostanza indesiderabile	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Contenuto massimo in mg/kg (ppm) di mangime con un tasso di umidità del 12 %
1. Aflatossina B <sub>1</sub>	Materie prime per mangimi	0,02
	Mangimi complementari e completi	0,01
	ad eccezione di: — mangimi composti per bovini da latte e vitelli, ovini da latte ed agnelli, caprini da latte e capretti, suinetti e pollame giovane	0,005
	— mangimi composti per bovini (eccetto bovini da latte e vitelli), ovini (eccetto ovini da latte ed agnelli), caprini (eccetto caprini da latte e capretti), suini (eccetto suinetti) e pollame (eccetto pollame giovane)	0,02

**Tabella 1.10. Reg. CE 574/2011.**

Risulta evidente come la normativa lasci poco spazio all'interpretazione e provveda, vista la pericolosità delle tossine in questione, a mettere chiarezza circa la possibilità di commercializzare prodotti contaminati.

Un discorso a parte va fatto per quanto riguarda il latte e i derivati lattiero caseari. In particolare Reg. CE 1831/2003 stabilisce un limite pari a 0,050 µg/Kg per la sola AFLA M1 nel latte crudo, latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte (Tabella 1.4). E' quindi da notare che per i prodotti a base di latte (quali ad es. burro, formaggio, panna etc.) non viene specificato nessun limite.

Inoltre nell'ambito dei prodotti lattiero-caseari è più frequente parlare di *carry over* inteso come il rapporto fra la quantità di micotossina ingerita

(AFLA B1) dall'animale e quella escreta (AFLA M1) nel latte; mediamente nella bovina la percentuale di passaggio è del 1-3%, con punte massime del 6,2% (IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna 2003).

Dal punto di vista pratico nelle bovine, per stimare il trasferimento di AFLA M1 nel latte è ormai ampiamente diffusa l'equazione proposta da Veldman *et al* nel 1992 (Veldman *et al.* 1992):

$$\text{AFLA M1 (ng/kg di latte)} = 1,19 \times \text{AFLA B1} (\mu\text{g/capo/d}) + 1,9$$

Secondo questa formula è possibile calcolare quanta AFLAB1 viene convertita in AFLAM1 (ad esempio: 40  $\mu\text{g/capo/die}$  di AFLAB1 = 49,5 ng/Kg latte AFLAM1 ovvero approssimando 0,05  $\mu\text{g/kg}$ ).

Nel latte ovino, in cui la percentuale di passaggio è del 0,26-0,33% (Battacone *et al.* 2005), la presenza di M1 può essere stimata a partire da una formula simile a quella vista sopra per le bovine:

$$\text{AFLA M1 (ng/kg di latte)} = 1,36 \times \text{AFLA B1} (\mu\text{g/capo/d}) + 4,3$$

Nel latte caprino esistono alcuni studi preliminari dai quali risulta che la percentuale di passaggio è dello 0,18-0,38% (Battacone *et al.* 2012).

Alla luce di quanto detto in merito al *carry over* e tenuti presenti alcuni processi produttivi caratteristici per alcuni tipi di formaggio, si giunge al concetto di concentrazione/diluizione di queste micotossine nei derivati lattiero caseari. A tal proposito l'articolo 2 comma 2 del REG 1881/2006 definisce:

## *“Articolo 2*

### ***Prodotti alimentari essiccati, diluiti, trasformati e composti***

*1. Nell'applicare i tenori massimi di cui all'allegato ai prodotti alimentari essiccati, diluiti, trasformati o composti da più di un ingrediente, si tiene conto di quanto segue:*

- a) modifiche della concentrazione del contaminante causate dai processi di essiccazione o di diluizione;*
- b) modifiche della concentrazione del contaminante causate dalla trasformazione;*
- c) le proporzioni relative degli ingredienti nel prodotto;*
- d) il limite analitico di quantificazione*

*2. I fattori specifici di concentrazione o diluizione relativi alle operazioni di essiccazione, diluizione, trasformazione e/o miscelazione di cui trattasi o ai prodotti alimentari essiccati, diluiti, trasformati e/o composti di cui trattasi vengono forniti e motivati dall'operatore del settore alimentare quando l'autorità competente effettua un controllo ufficiale.*

*Se l'operatore del settore alimentare non fornisce il fattore di concentrazione o diluizione necessario o se l'autorità competente ritiene tale fattore inadeguato alla luce della motivazione adottata, è l'autorità stessa a definire il fattore in base alle informazioni disponibili, perseguendo nel contempo la massima protezione della salute pubblica.*

*3. I paragrafi 1 e 2 si applicano in assenza di specifici tenori massimi comunitari stabiliti per questi prodotti alimentari essiccati, diluiti, trasformati o composti.*

*4. Ove la legislazione comunitaria non preveda tenori massimi specifici per gli alimenti destinati ai lattanti e ai bambini, gli Stati membri possono stabilire livelli più restrittivi.”*

Il Decreto Ministeriale del 31 Luglio 2001 delle Politiche Agricole e Forestali (oggi denominato *MIPAAF*) nell'allegato 2 come fattori di concentrazione o di diluizione previsti dall'articolo 2, comma 2 del Reg. CE 1881/2006 chiarisce che per la determinazione dei suddetti fattori di concentrazione/diluizione è necessario tener conto della distribuzione non uniforme della AFLAM1 nelle diverse frazioni che compongono la matrice latte.

L'AFLAM1, infatti come l'AFLAB1, ha un'alta affinità per le proteine pertanto si ripartisce in modo differente a seconda che si prendano in considerazione i prodotti di caseificazione ottenuti dal siero o dalla cagliata. Soltanto piccole concentrazioni, invece, si ritrovano nella panna e nei prodotti derivati a causa della bassa affinità per i lipidi da parte di queste micotossine.

Il Decreto del Ministero MIPAAF n. 119 del 31 Luglio 2003 definisce i coefficienti di trasformazione in equivalente latte nei formaggi (Tabella 1.11) di denominazione nota.

Allegato 2

ELENCO DEI COEFFICIENTI DI TRASFORMAZIONE IN EQUIVALENTE LATTE NEI FORMAGGI

FORMAGGIO	COEFFICIENTE
Parmigiano reggiano	15,15
Grana padano	15,15
Asiago d'allevio	10,54
Asiago pressato	8,95
Montasio	10,00
Fontina, Bitto, Branzi	9,35
Altri a pasta semicotta	10,50
Provolone Valpadana	11,11
Caciocavallo Silano	10,52
Mozzarella	7,92
Scamorza	8,33
Gorgonzola	8,33
Italico	8,65
Crescenza, Casatella, Stracchino	6,66
Taleggio, Quattroformaggio lombardo	8,33
Robiola	7,00
Bra duro	11,11
Bra tenero	9,50
Raschera	11,00
Castelmagno	11,50
Toma piemontese	9,09
Caciotta	11,00
Yogurt	1,12

**Tabella 1.11. Allegato 2 DM 31 Luglio 2003 MIPAAF.**

Da cui ne risulta che per calcolare il limite massimo di AFLA M1 nel formaggio bisogna moltiplicare il rispettivo coefficiente di trasformazione per il limite di AFLA M1 nel latte:

$$\text{max AFLAM1 nel formaggio} = \text{max AFLAM1 latte} \times \text{Coeff di Conc.}$$

Per tutti i prodotti caseari non compresi nell'allegato (Tabella 1.11) si utilizzano i coefficienti normalmente praticati nella regione per i tipi di formaggio interessati o comunque forniti dal produttore.

Il CNSA (Centro Nazionale Sicurezza Alimentare) nel parere n. 13 del 10 Luglio 2013 però ritiene che i *coefficienti di trasformazione in equivalente latte* previsti per alcuni tipi di formaggi all'allegato 2 del DM MIPAAF del 31 Luglio 2003 non possano essere consideranti tali in quanto non tengono in considerazione il destino dell'AFLAM1 nelle frazioni di cui il latte si compone ma ne considerano solo la resa.

Pertanto, ad oggi, gli unici coefficienti di trasformazione raccomandati in via provvisoria dal Ministero della Salute, in assenza di un coefficiente specifico per una data tipologia di formaggio fissato dall'operatore del settore *ad hoc*, sono i seguenti:

- 3,0 per i formaggi a pasta tenera e prodotti derivati dal siero;
- 5,5 per i formaggi a pasta dura.

## 1.4 METODI DI ANALISI

Per quanto riguarda i metodi analitici per la determinazione e la quantificazione delle micotossine bisogna precisare che la scelta è influenzata da diversi fattori quali: rapidità dell'analisi, necessità di determinare una o più micotossine, necessità di avere risultati certi, applicabilità alle differenti matrici.

Le tipologie di analisi possono essere divisi in metodi di screening e metodi di conferma:

Tra i metodi di screening più diffusi vi sono i saggi immunologici, come l'ELISA (*Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay*); il principio si basa sull'identificazione di un particolare anticorpo mediante il legame con l'antigene specifico, l'evidenza di un complesso antigene-anticorpo indicante la presenza dell'anticorpo cercato nonché la reazione semi-quantitativa.

Le caratteristiche sono di questo metodo sono:

- specificità (per una determinata micotossina o per gruppi di esse);
- buona sensibilità (anche di ppt);
- buona attendibilità dei risultati;
- semplicità di esecuzione del test;
- rapidità;
- non richiedono apparecchiature complesse (Kit specifici);
- i costi contenuti.

Tuttavia questa metodica non permette di discriminare tra i sottotipi di micotossina (es. AFLA M1-M2; AFLA B1-B2 AFLA MG1-G2).

Risulta ovvio come una particolare attenzione va posta nella scelta del kit da utilizzare: la matrice da analizzare, la sensibilità che si vuole ottenere, la



velocità di analisi ma soprattutto la qualità del kit sono parametri determinanti nella scelta di ciò che offre il mercato.

Questa metodologia deve essere considerata come metodica di screening per i vantaggi sopra citati tenuto conto che si verificano molto di rado dei falsi negativi mentre i risultati positivi possono essere sovrastimati e richiedono un metodo di conferma.

La tecnica di conferma per i campioni risultati positivi nei test di screening (come i test ELISA sopra citati) è sicuramente la cromatografia liquida; le caratteristiche dell'analisi sono le seguenti:

- sensibilità (soprattutto se accoppiato a spettrometria di massa);
- specificità (si possono determinare i sottotipi di micotossine)
- accuratezza e precisione dei risultati.

Tuttavia la strumentazione è complessa e costosa, richiede personale qualificato ed esperto, è possibile analizzare un campione alla volta e la tempistica di analisi è piuttosto lunga.

Indipendentemente dal metodo scelto ed impiegato, all'interno del procedimento analitico è possibile individuare le seguenti fasi:

- 1) campionamento;
- 2) estrazione;
- 3) purificazione (clean-up);
- 4) separazione;
- 5) determinazione e quantificazione.

Ciascuna fase può essere fonte di errore e in quanto tale va monitorata ed eseguita con cura e attenzione, tuttavia il corretto campionamento è fondamentale come primo passo per ottenere un'analisi significativa.

Sicuramente la tipologia di matrice da analizzare può determinare approcci diversi per campioni eterogenei (mangimi, granaglie) piuttosto che per campioni omogenei (latte, formaggi, farine); l'omogeneità del campione rappresenta un buon presupposto per ottenere un campione significativo, pur non escludendo l'omogeneità della partita e la rappresentatività della partita in esame. Inoltre anche la quantità di campione da analizzare può variare, sarà necessario prelevare in più punti e in maggior quantità da campioni eterogenei, mentre saranno sufficienti quantità minori per campioni omogenei (CAST 2003). Tuttavia per quel che concerne i metodi di campionamento (e di analisi) per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari il Regolamento CE 401/2006 dispone di indicazioni precise per ogni tipologia di matrice.

La fase di estrazione si basa sulla solubilità delle micotossine nei solventi o nelle soluzioni acquose contenenti solventi organici polari (Rizzi 2001), la scelta del solvente di estrazione tiene in considerazione le caratteristiche chimico-fisiche degli analiti e della matrice ma anche le procedure analitiche scelte, il costo del solvente e la mancanza degli effetti tossici per l'uomo. Tuttavia spesso accade che la scelta del solvente rappresenti un compromesso tra il solvente ideale e il solvente maggiormente compatibile con la tecnica analitica che si è scelto di impiegare ((Pietri 2001) 2001), soprattutto per quanto riguarda l'analisi multi-residuale. Ad esempio i solventi clorurati sono molto efficaci nell'estrarre l'aflatossina dal mais, ma non essendo miscibili in acqua non possono essere usati qualora si preveda di usare una tecnica analitica che sfrutta le soluzioni acquose, come ad esempio l'ELISA.

Grazie alle tecniche di purificazione o clean-up l'analita può essere ulteriormente separato da lipidi o altre molecole presenti nella matrice, che potrebbero interferire con le fasi successive (CAST 2003); il *clean-up* permette inoltre di ottenere un'ulteriore concentrazione della micotossina prima della fase di quantificazione ((Pietri 2001) 2001). Proprio grazie a

queste proprietà, di purificazione e concentrazione dell'analita, il *clean-up* rappresenta un passaggio spesso eseguito prima di alcune metodiche analitiche cromatografiche al fine di incrementare la specificità e la sensibilità. Altre metodiche tipo l'ELISA non prevedono invece la fase di *clean-up* vera e propria ma solo una diluizione e/o filtrazione dell'estratto (Pietri 2001) 2001). La purificazione dell'estratto può essere effettuata principalmente in due modi: tramite l'utilizzo di cartucce di estrazione in fase solida SPE oppure mediante l'impiego di colonnine ad immunoaffinità (IAC) (Sulyok *et al.* 2006). Nelle cartucce SPE si trova una fase stazionaria in grado di trattenere in maniera più o meno tenace i componenti dell'estratto a seconda della loro caratteristiche chimico-fisiche. I materiali che generalmente vengono sfruttati per tale scopo sono la polvere di silice oppure i polimeri legati a catene funzionalizzate. Con la scoperta degli anticorpi monoclonali e la nascita delle colonne di immunoaffinità, le SPE sono state sempre meno impiegate. Le colonne di immunoaffinità permettono infatti di ottenere una maggiore purificazione dell'estratto e una maggiore selettività per le micotossine ((Pietri 2001) 2001). Queste colonne consistono in piccoli cilindri di plastica contenenti un gel di agarosio su cui sono legati covalentemente gli anticorpi specifici anti micotossine (specifici per ogni una di esse). L'estratto da purificare viene fatto passare attraverso tale colonna e la micotossina eventualmente presente si lega agli anticorpi specifici, venendo in tale maniera separata da tutte le altre sostanze interferenti della matrice. Quindi viene eseguito un lavaggio con acqua che permette di allontanare dalla colonna eventuali interferenti, infine viene effettuata una eluizione della micotossina ricercata sfruttando un solvente organico in grado di rimuovere l'antigene micotossina dall'anticorpo (Cappelli e Vannucchi 1998).

La fase finale del procedimento analitico prevede la determinazione/quantificazione degli analiti in esame.

Utilizzando sistemi cromatografici i componenti fuoriescono dalla colonna in tempi diversi e per poterli riconoscere ed identificare è necessario

accoppiare un sistema di rilevazione (detector), che in base alle caratteristiche peculiari di ciascun componente, genera un segnale che una volta convertito in impulso elettrico viene registrato sotto forma di picco cromatografico; la distribuzione, il tempo di ritenzione e l'area sottesa relativa a ciascun picco daranno indicazioni qualitative e quantitative sui componenti dell'estratto (Kokkonen *et al.* 2007).

Tra i diversi tipi di detectors quello più frequentemente accoppiato all'HPLC è il fluorimetro il quale, sfruttando la particolare fluorescenza di alcune micotossine, risulta avere una specificità maggiore rispetto allo spettrofotometro UV.

I metodi per un'analisi quantitativa delle micotossine si avvalgono spesso dell'utilizzo di analisi cromatografica (HPLC o UPLC) accoppiata a spettrometria di massa (MS) in grado di riconoscere le molecole in base al loro peso molecolare; recentemente sono emersi diversi metodi analitici rapidi, basati su tecnologie innovative quali l'immuno-cromatografia, polarizzazione di fluorescenza, spettroscopia a infrarossi, polimeri a stampo molecolare (MIP) e biosensori. L'affermazione del binomio cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS) lo si deve alle ottime capacità di sensibilità, specificità e all'accuratezza nella quantificazione degli analiti in accordo con i requisiti richiesti dalle vigenti normative. La spettrometria di massa tandem (MS-MS) ha poi apportato un ulteriore miglioramento a questa tecnica, garantendo ancor più alti livelli di selettività molecolare (riconoscendo lo ione precursore e i suoi rispettivi ioni prodotto). Molti autori si sono avvalsi della cromatografia liquida accoppiata a spettrometro di massa per validare metodi di analisi multi-residuale di micotossine in matrici biologiche: Soleymany *et al.* hanno messo a punto un metodo per la determinazione di 7 micotossine in cereali (Sulyok *et al.* 2006), Berthiller *et al.* hanno lavorato per individuare 9 micotossine in mais, Oueslati *et al.* hanno ricercato 10 micotossine in cereali e derivati (Tanaka *et al.* 2006), Sulyok *et al.* infine hanno validato un metodo in Qtrap LC-

MS/MS per la determinazione di 39 micotossine in cereali e grano (Oueslati *et al.* 2012).

La necessità di validare metodi analitici in grado di determinare contemporaneamente diverse tipologie di micotossine scaturisce dalla capacità di queste muffe di cross-contaminare le materie prime e di sommare l'azione tossica esplicita dalle rispettive tossine. Tuttavia le diversità chimico-strutturali degli analiti rappresentano una sfida non da poco: molti infatti sono le variabili da testare e altrettanti sono i compromessi a cui bisogna cedere durante la preparazione del campione (Oueslati *et al.* 2012).

Per quanto riguarda i metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari il Regolamento CE 401/2006 dispone di indicazioni precise per ogni tipologia di matrice (Tabella 1.12).

Suddivisione delle partite in sottopartite in funzione del prodotto e del peso della partita

Prodotto	Peso della partita (t)	Peso o numero delle sottopartite	Numero di campioni elementari	Peso del campione globale (kg)
Cereali e prodotti derivati	≥ 1 500	500 t	100	10
	> 300 e < 1 500	3 sottopartite	100	10
	≥ 50 e ≤ 300	100 t	100	10
	< 50	—	3-100 (*)	1-10

(\*) In funzione del peso della partita — cfr. tabella 2.

Numero minimo di campioni elementari da prelevare da una partita

Forma di commercializzazione	Volume o peso della partita (l o kg)	Numero minimo di campioni elementari da prelevare	Volume o peso minimo del campione globale (l o kg)
Alla rinfusa	—	3-5	1
Bottiglie/brik	≤ 50	3	1
Bottiglie/brik	50-500	5	1
Bottiglie/brik	> 500	10	1

**Tabella 1.12. Metodi di campionamento per cereali e prodotti derivati, latte e derivati lattiero caseari; Reg. CE 401/2006.**

Secondo il Regolamento 401/2006 (Tabella 1.13):

*“I metodi di analisi utilizzati per il controllo alimentare devono essere conformi alle disposizioni dei punti 1 e 2 dell’allegato III del Regolamento (CE) n. 882/2001*

*Se a livello comunitario non è prescritto alcun metodo specifico per la determinazione dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, i laboratori sono liberi di applicare il metodo di loro scelta, a condizione che esso rispetti i criteri seguenti”*

a) Criteri di rendimento per le aflatossine

Criterio	Intervallo di concentrazione	Valore raccomandato	Valore massimo consentito
Bianchi	Tutti	Trascurabile	—
Recupero — Aflatossina M1	0,01-0,05 µg/kg	60-120 %	
	> 0,05 µg/kg	70-110 %	
Recupero — Aflatossine B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	< 1,0 µg/kg	50-120 %	
	1-10 µg/kg	70-110 %	
	> 10 µg/kg	80-110 %	
Precisione RSD <sub>R</sub>	Tutti	Derivato dall'equazione di Horwitz	2 volte il valore derivato dall'equazione di Horwitz

La precisione RSD<sub>r</sub> può essere calcolata moltiplicando per 0,66 la precisione RSD<sub>R</sub> alla concentrazione di interesse.

*Nota*

- Valori da applicare tanto a B<sub>1</sub>, quanto alla somma di B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>.
- Se le somme delle aflatossine singole B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub> devono essere registrate, la risposta di ciascuna di esse al metodo d'analisi deve essere nota o equivalente.

b) Criteri di rendimento per l'ocratossina A

Tenore µg/kg	Ocratossina A		
	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Recupero %
< 1	≤ 40	≤ 60	50-120
1-10	≤ 20	≤ 30	70-110

d) Criteri di rendimento per il desossinivalenol

Tenore µg/kg	Desossinivalenol		
	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Recupero %
> 100-≤ 500	≤ 20	≤ 40	60-110
> 500	≤ 20	≤ 40	70-120

e) Criteri di rendimento per lo zearalenone

Tenore µg/kg	Zearalenone		
	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Recupero %
≤ 50	≤ 40	≤ 50	60-120
> 50	≤ 25	≤ 40	70-120

f) Criteri di rendimento per le fumonisine B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>

Tenore µg/kg	Fumonisine B <sub>1</sub> or B <sub>2</sub>		
	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Recupero %
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60-120
> 500	≤ 20	≤ 30	70-110

**Tabella 1.13. Criteri di rendimento per le analisi ufficiali; Reg. CE 401/2006.**

Per la determinazione di micotossine in matrici alimentari esistono inoltre dei riferimenti circa il metodo da utilizzare emesse da enti preposti:

- A.O.A.C (prima *Association of Official Agricultural Chemists* oggi *Association Of Analytical Communities*) rappresenta un ente internazionale indipendente per lo sviluppo di metodi analitici standard accettati e riconosciuti a livello internazionale;
- C.E.N. (*European Committee for Standardization*) rappresenta un ente europeo indipendente per lo sviluppo di metodi analitici standard accettati e riconosciuti a livello comunitario.

## 2. SCOPO DEL LAVORO

---

Lo scopo del lavoro è stato quello di mettere a punto e validare differenti metodi analitici mediante cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata a spettrometria di massa tandem (UPLC-MS/MS) in grado di rilevare contemporaneamente (analisi multi-residuale) molteplici micotossine all'interno di diverse matrici biologiche.

Il primo punto prevedeva di studiare un metodo per la quantificazione di alcune tra le più importanti e diffuse micotossine, Aflatossina B1, Aflatossina B2, Aflatossina G1, Aflatossina G2, Fumonisina B1, Fumonisina B2, Zearalenone, Deossinivalenolo e Ocratossina, in mangimi industriali completi per l'alimentazione di cani.

L'obiettivo successivo è stato quello di valutare l'applicabilità del metodo e l'eventuale contaminazione di mangimi disponibili sul mercato italiano, prendendo in considerazione due categorie commerciali (Standard e Premium).

Un ulteriore scopo è stato quello di mettere a punto una seconda metodica per la determinazione delle micotossine sopra citate, in campioni di formaggio. In questa matrice è stata considerata anche l'aflatossina M1, specifica dei prodotti lattiero - caseari. Dopo aver validato il metodo l'obiettivo finale è stato quello di valutarne l'applicabilità in differenti tipologie di formaggio.

In conclusione, lo scopo ultimo del lavoro è stato quello di ampliare la disponibilità di metodi analitici per la determinazione di contaminanti in matrici complesse ancora poco studiate.



## 3. MATERIALI E METODI

---

### 3.1 PET FOOD

#### 3.1.1 MATERIALI E ATTREZZATURE

##### 3.1.1.1 *UPLC-MS/MS*

Per l'analisi dei campioni in esame è stato utilizzato un cromatografo liquido ad ultra prestazione accoppiato a spettrometro di massa a tandem, di seguito denominato UPLC-MS/MS. Lo strumento è costituito da una pompa binaria Waters Acquity UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) (Waters Corporation, Milford MA, USA), con degasatore, autocampionatore termostato, autocampionatore e termostato per colonna.

Lo spettrometro di massa è dotato di triplo quadrupolo Water Quattro Premier XE con interfaccia ESCi Multi-Mode (Waters Corporation, Milford MA, USA).

La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna Waters Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (1.7  $\mu$ m, 2,1 x 50 mm), abbinata ad una precolonna VanGuard<sup>™</sup>, con le medesime caratteristiche di fase stazionaria (Waters Corporation, Milford MA, USA).

I dati sono stati acquisiti e processati utilizzando il software ChromQuest Waters MassLynx<sup>™</sup> 4.1 fornito dalla casa madre (Waters Corporation, Milford MA, USA).

L'azoto utilizzato per il funzionamento dello spettrometro di massa è stato prodotto da un generatore DBS N2-Mistral-4 (DBS Strumenti Scientifici, Padova, Italia).

### **3.1.1.2    *Altri materiali ed attrezzature***

Per la preparazione dei campioni sono state utilizzate le seguenti apparecchiature:

- ✓ Sistema per purificazione dell'acqua (Human Corporation, Seul, Korea);
- ✓ Agitatore Vortex (Velp Scientific, Monza e Brianza, Italia)
- ✓ Centrifuga (Hettich, Kirchleugern, Germania);
- ✓ Frigorifero a temperatura  $4 \pm 2^{\circ} \text{C}$ , monitorato da termometro;
- ✓ Congelatore a temperatura minore di  $-18^{\circ} \text{C} \pm 4^{\circ} \text{C}$ , monitorato da termometro;
- ✓ Pipette automatiche (Gilson, Middleton, WI, USA);
- ✓ Concentratore di campioni a flusso di azoto;
- ✓ Bagnomaria;
- ✓ Filtri per siringa Millex<sup>®</sup> in hydrophobic (PTFE) FH 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland).

### **Standards**

- ✓ AFLAB1: Aflatoxin B1 da *Aspergillus flavus*, purezza  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA);
- ✓ AFLAB2: Aflatoxin B2 da *Aspergillus flavus*, purezza  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA);
- ✓ AFLAG1: Aflatoxin G1 da *Aspergillus flavus*, purezza  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA);
- ✓ AFLAG2: Aflatoxin G2 da *Aspergillus flavus*, purezza  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA);

- ✓ FB1: Fumonisin B1 da *Fusarium moniliforme*, purezza  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA);
- ✓ FB2: Fumonisin B2 da *Fusarium moniliforme*, purezza  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA);
- ✓ DON: Deoxynivalenol, purezza  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA);
- ✓ OTA: Ochratoxin A da *Tetromyces albertensis*, purezza  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA).
- ✓ ZEA: Zearalenone, micotossina fungina, purezza  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA);

Come standard interni sono state utilizzate molecole marcate:

- ✓ AFLAB13C13: U-[13C15]-Aflatoxin B1 in aceto nitrile, purezza  $99\% \pm 1\%$  (Biopure, Tulln, Austria);
- ✓ FB13C13: U-[13C15]-Fumonisin B1 in acetonitrile-water, purezza  $97,8\% \pm 2,2\%$  (Biopure, Tulln, Austria);
- ✓ DONC13: U-[13C15]-Deoxynivalenol in aceto nitrile, purezza  $99,5\% \pm 0,5\%$  (Biopure, Tulln, Austria);
- ✓ OTAC13: U-[13C15]-Ochratoxin in aceto nitrile, purezza  $98,7\% \pm 1,3\%$  (Biopure, Tulln, Austria).
- ✓ ZEAC13: U-[13C15]-Zearalenone in acetonitrile, purezza  $99,2\% \pm 0,8\%$  (Biopure, Tulln, Austria);

Tutti i solventi utilizzati per l'analisi in spettrometria di massa erano di grado LC-MS, mentre quelli utilizzati per la fase di estrazione erano di grado analitico:

- ✓ Metanolo (Sigma)

- ✓ Acetonitrile (VWR)
- ✓ Acqua ultrapura (prodotta in laboratorio)
- ✓ Acido acetico (Sigma)
- ✓ Acido formico (Fluka)
- ✓ Ammonio acetato (Fluka)

### **3.1.1.3      *Campioni***

In collaborazione con il Servizio di Zootecnia, Nutrizione ed Alimentazione (ZNA) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DSMV) di Bologna, si è deciso di prelevare i campioni considerando due fasce di mangimi completi per cani reperibili in commercio, in accordo con il loro valore commerciale.

Per mangime completo si fa riferimento a “mangimi composti che, per la loro composizione, sono sufficienti per una razione giornaliera” (Reg CE 767/09).

Sono stati prelevati 25 campioni di fascia *Standard* (Tabella 3.1) e 24 campioni di fascia *Premium* (Tabella 3.2); in questa ultima fascia sono inclusi anche alcuni mangimi destinati a particolari fini nutrizionali e definiti “dietetici” ai sensi dell’articolo 18 lettera A del Reg. CE 767/09.

Le confezioni, di pezzatura variabile (5 kg – 300 g) sono state acquistate presso svariati punti vendita (dal discount al punto vendita specializzato).

**Tabella 3.3. Campioni di fascia *Standard* e rispettiva descrizione.**

<b>STANDARD</b>	
<b>#1</b>	Crocchette Manzo & cereali
<b>#2</b>	Special Menu con manzo, riso e verdure
<b>#3</b>	Crocchette con manzo, pollo, pesce e cereali soffiati
<b>#4</b>	Crocchette Menu completo
<b>#5</b>	Nuggets con inulina
<b>#6</b>	Adult regular crocchette con carne
<b>#7</b>	Croquettes au boeuf
<b>#8</b>	Crocchette con pollo, manzo, pesce, mais e riso soffiato
<b>#9</b>	Adulto
<b>#10</b>	Adult small medium
<b>#11</b>	Mantenimento
<b>#12</b>	Adult con manzo, pollo e tacchino
<b>#13</b>	Mantenimento A
<b>#14</b>	Mantenimento B
<b>#15</b>	Mantenimento C
<b>#16</b>	Mantenimento D
<b>#17</b>	Mantenimento E
<b>#18</b>	Mantenimento F
<b>#19</b>	Mantenimento G
<b>#20</b>	Mantenimento H
<b>#21</b>	Mantenimento I
<b>#22</b>	Pollo Junior
<b>#23</b>	Adult Mini Carni bianche verdure
<b>#24</b>	Mini Menù Manzo Cereali

**Tabella 3.4. Campioni di fascia *Premium* e rispettiva descrizione..**

<b><i>PREMIUM</i></b>	
<b>#26</b>	Mini Puppy & Junior
<b>#27</b>	Medium Adult
<b>#28</b>	Mini baby + junior <sup>29</sup>
<b>#29</b>	Adult Mini fit & well
<b>#30</b>	Obesity*
<b>#31</b>	Intestinal*
<b>#32</b>	Gastro-Intestinal*
<b>#33</b>	Obesity*
<b>#34</b>	Adult Mini Horse-Peas-Oil*
<b>#35</b>	Puppy Original 2-12*
<b>#36</b>	Adult Small & Mini*
<b>#37</b>	Mature Adult Mini/Medium*
<b>#38</b>	Renal Low Calorie*
<b>#39</b>	Puppy Mini*
<b>#40</b>	Adult X-Small*
<b>#41</b>	Junior X-Small*
<b>#42</b>	Gastrointestinal*
<b>#43</b>	Obesity Management*
<b>#44</b>	Puppy Small Breed*
<b>#45</b>	Adult Small Breed
<b>#46</b>	Intestinal*
<b>#47</b>	Restricted Calorie*
<b>#48</b>	Puppy & Junior MEDIUM*
<b>#49</b>	Gastrointestinal Health*

**\* = mangimi dietetici**

### 3.1.2 MODALITÀ PER L'ESECUZIONE DELLA PROVA

#### 3.1.2.1 *Preparazione delle soluzioni standard*

Le soluzioni standard utilizzate per la preparazione dei QC (Quality Control) e dei campioni per la calibrazione della retta sono state preparate in accordo con la seguente procedura:

- ✓ *Stock solutions:* Per ogni analita è stata preparata una stock solution a 20 ppm, solubilizzando 1 mg di standard in 50 µL di solvente. Per le aflatossine, il DON, l'OTA e lo ZEN la diluizione è effettuata in aceto nitrile mentre per le FB1 e FB2 invece è stata utilizzata una soluzione di acqua : acetonitrile = 1 : 1.
- ✓ *Standard MYCO\_9:* Sono stati prelevati 250 µL da ciascuna soluzione *stock solution* a 20 ppm e portati a volume in 5 mL di aceto nitrile, ottenendo così una miscela dei 9 analiti alla concentrazione di 1 ppm.
- ✓ *Standard MARC\_4:* Sono stati prelevati 40 µL dalle soluzioni commerciali degli standard marcati di DON, FB1, ZEA a 25 ppm e di OTA a 10 ppm, portati a volume in 1 mL di aceto nitrile, ottenendo così una soluzione a 1 ppm di, DONC13, FB1C13 e ZEAC13e a 400 ppb di OTAC13.
- ✓ *Standard MARC\_AFLA:* Sono stati prelevati 150 µL dalla soluzione commerciale a 500 ppb di AFLA B1 marcata e si porta a 300 µL di acetonitrile, ottenendo una soluzione AFLAB1C13 a 250 ppb.

Tutte le soluzioni standard preparate sono state conservate in congelatore alla temperatura di -20° C.

Per l'estrazione e purificazione del campione sono state infine preparate le seguenti soluzioni:

- ✓ *Soluzione per l'estrazione ( $\text{CH}_3\text{CN}$  /  $\text{H}_2\text{O}$  / Ac.A 74 : 25 : 1):* lavorando sotto cappa, sono stati miscelati 740 mL di acetonitrile, 25 mL acqua e 1 mL di ac. acetico, agitati e si conservati in frigorifero.
- ✓ *Soluzione per riprendere i campioni ( $\text{H}_2\text{O}$  /  $\text{CH}_3\text{CN}$  / Ac.F 95 : 5 : 0,1 con 10 mM di Am.Ac):* lavorando sotto cappa, sono stati miscelati 95 mL di acqua, 5 mL di acetonitrile e 100  $\mu\text{L}$  di ac. formico, aggiungendo circa 8 mg di ammonio acetato, agitati e conservati in frigorifero.

### **3.1.2.2 Estrazione del campione**

#### Pretrattamento

I campioni di mangime secco per cani, in aliquote da 100 grammi, sono stati macinati al fine di ottenere un campione il più omogeneo possibile e successivamente conservati a temperatura ambiente in barattoli di plastica sigillati.

#### Estrazione

Per l'estrazione sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

1. E' stato pesato 1 grammo di campione di mangime in un becker e fortificato con gli standard interni marcati aggiungendo 50  $\mu\text{L}$  di *Stdandard MARC\_4* e 20  $\mu\text{L}$  di *Standard MARC\_AFLA* (Tabella 3.3) sono stati aggiunti 4 mL della *soluzione di estrazione* e il tutto è stato mantenuto su agitatore magnetico per 2 ore.



**Tabella 3.3. Schema per la fortificazione dei campioni con gli standard marcati.**

Concentrazione (ppb)	Std MARC_4 (µl)	Std MARC_AFLA (µl)
0	50	20
5	50	20
20	50	20
50	50	20
100	50	20
200	50	20
500	50	20

2. il campione è stato trasferito in provette falcon e centrifugato per 20 minuti a 4000 rpm con temperatura di 20 C°;
3. sono stati prelevati 500 µL di surnatante e trasferiti in provette di vetro;
4. la provetta è stata posizionata all'interno di un bagnomaria ad una temperatura inferiore a 40°C, e sotto flusso di azoto fino alla completa de solvatazione;
5. l'essiccato è stato infine ripreso con 500 µL della *soluzione per riprendere i campioni*,
6. filtrato con filtri millipore e trasferito in vials per l'analisi cromatografica in UPLC-MS/MS.

Durante la giornata di analisi i campioni sono stati mantenuti a 22° C nell'autocampionatore dell'UPLC.

### 3.1.2.3 Condizioni strumentali - Cromatografia liquida

Le analisi sono state eseguite in condizioni programmate con flusso di 0,42 mL/min., la fase mobile era costituita da:

- ✓ Fase A: acqua con 0,1% di acido formico;
- ✓ Fase B: metanolo con 0,1% di acido formico.

Il volume di iniezione è stato fissato a 10 µl in modalità “full loop” e la colonna mantenuta ad una temperatura di 40° C.

La corsa cromatografica è stata impostata ad una durata di 16 minuti e il gradiente cromatografico impostato come mostrato in Tabella 3.4.

**Tabella 3.5. Condizioni cromatografiche.**

<b>Fase mobile A</b>		Acqua + 0.1% di Acido Formico
<b>Fase mobile B</b>		Metanolo + 0.1% di Acido Formico
<b>Gradiente</b>	<b>T<sub>0</sub></b>	95% Fase A - 5% Fase B
	<b>T<sub>2</sub></b>	95% Fase A - 5% Fase B
	<b>T<sub>4</sub></b>	90% Fase A - 10% Fase B
	<b>T<sub>12</sub></b>	25% Fase A - 75% Fase B
	<b>T<sub>12,1</sub></b>	1% Fase A - 99% Fase B
	<b>T<sub>14</sub></b>	1% Fase A - 99% Fase B
	<b>T<sub>14,1</sub></b>	95% Fase A - 5% Fase B
	<b>T<sub>16</sub></b>	95% Fase A - 5% Fase B
<b>Flusso</b>		0,42 mL/min
<b>Volume di iniezione</b>		10 µL
<b>Temperatura</b>		40 °C

Le soluzioni utilizzate per il lavaggio dell'ago di iniezione, prima e dopo l'avvio dell'analisi, sono state:

- ✓ *Strong solution*: acqua, acetonitrile e metanolo nelle proporzioni di 30:30:40 con 0,2% di acido formico;
- ✓ *Weak solution*: acqua e metanolo nelle proporzioni di 95:5 con 0,1% di acido formico.

#### **3.1.2.4      Condizioni strumentali – spettrometria di massa**

La modalità di ionizzazione utilizzata per ogni composto da analizzare è stata l'elettrospray positivo (ESI<sup>+</sup>).

Lo strumento ha operato in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring), osservando due transizioni per ognuno degli analiti target e per i relativi standard interni.

Come gas di collisione è stato utilizzato l'argon.

I parametri impostati per lo spettrometro di massa sono stati:

- ✓ Voltaggio del Capillare: 3,5 KV;
- ✓ Voltaggio dell'estrattore: 2,00 V;
- ✓ Temperatura della sorgente: 130° C;
- ✓ Temperatura di desolvatazione: 450° C;
- ✓ Flusso del gas del cono: 50 L/h;
- ✓ Flusso del gas di desolvatazione: 450 L/h.

Di seguito (Tabella 3.5) vengono riportati le transizioni degli ioni monitorati, i voltaggi del cono e le energie di collisione.

**Tabella 3.5. Transizioni e parametri strumentali MS/MS.**

Analita	ione precursore (m/z)	ione prodotto (m/z)	Voltaggio cono (kV)	Energia di collisione (eV)
AFLAB1	312,80	241,00	45	36
		285,00	45	22
AFLAB2	315,00	259,00	45	38
		287,00	46	33
AFLAG1	329,00	243,00	45	26
		283,00	45	24
AFLAG2	331,00	245,00	46	39
		313,00	46	33
DON	296,90	230,90	19	12
		248,90	19	10
FB1	722,20	334,20	52	45
		352,20	52	43
FB2	706,10	318,30	50	40
		336,34	50	38
OTA	403,90	221,90	25	37
		238,90	25	25
ZEA	318,95	184,90	20	30
		282,90	20	12

Nella Tabella 3.6 sono riportati i valori relativi agli standard marcati:

**Tabella 3.6. Transizioni e parametri strumentali MS/MS relativi agli standard marcati.**

Analita	Ione precursore (m/z)	Ione figlio (m/z)	Cone Voltage (kV)	Collision Energy (eV)
AFLAB1C13	329,90	300,90	45	22
		255,00	45	38
DONC13	311,90	216,00	22	18
		263,00	22	13
FB1C13	756,20	356,20	52	45
		374,20	52	40
OTAC13	423,85	231,90	26	38
		249,90	26	25
ZEAC13	337,10	300,90	20	12
		199,00	20	18

### 3.1.3 VALIDAZIONE DEL METODO

Per procedere con la validazione del metodo è stato necessario individuare una matrice che non contenesse originariamente le micotossine oggetto di analisi (matrice “bianca”).

Dei 49 campioni totali 12 sono stati estratti ed analizzati secondo il metodo descritto nel *paragrafo 3.1.2* delle modalità di preparazione della prova, ma nessuno di questi campioni è risultato privo dei contaminanti in oggetto, quindi non idoneo ad essere considerato “bianco”. È stato perciò necessario selezionare tra questi un campione con il livello di micotossine più basso (campione #34), assumendolo come “bianco”, per poter procedere con le prove necessarie alla valutazione delle prestazioni del metodo, in termini di linearità, precisione, esattezza, specificità e sensibilità.

#### 3.1.3.1 *Linearità*

Per verificare la linearità del metodo è stata costruita, per ciascun analita, una curva di calibrazione ottenuta fortificando il campione “bianco” a sette livelli di concentrazione (0ppb, 5ppb, 20ppb, 50ppb, 100ppb, 200ppb e 500ppb); l'operazione è stata ripetuta per AFLAB1, AFLAB2, AFLAG1, AFLAG2, DON, FB2, OTA e ZEA (Tabella 3.7). Per quanto riguarda la FB1, è stato valutato l'inserimento di un ulteriore punto (2000ppb) per permettere una corretta quantificazione dei numerosi campioni risultati contaminati oltre i 500ppb.

I campioni sono stati infine estratti ed iniettati nel sistema LC-MS/MS.

**Tabella 3.7. Schema per la fortificazione dei campioni.**

Concentrazione (ppb)	Working solution mix 9 (µl)
0	0
5	5
20	20
50	50
100	100
200	200
500	500

#### **3.1.3.2 Specificità**

Per valutare la specificità del metodo e non disponendo di campioni “bianchi” (come accennato all’inizio del *paragrafo 3.1.3* della validazione), è stato necessario fortificare a concentrazioni note crescenti i 12 campioni risultati meno contaminati degli altri.

#### **3.1.3.3 Sensibilità - Limite di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ)**

Utilizzando la retta di calibrazione, sono stati calcolati anche il limite di determinazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ). Il LOD non è altro che la concentrazione minima dell'analita in grado di produrre un segnale significativamente diverso da quello prodotto in un campione “bianco”, quindi corrisponde ad un rapporto segnale/rumore (s/n ratio) pari a 3 . Il LOQ, invece, è stato calcolato come il punto più basso della curva di

calibrazione di cui sono stati ottenuti valori di precisione ed esattezza accettabili.

#### **3.1.3.4      *Esattezza e precisione***

Per calcolare l'esattezza e la precisione del metodo sono state processate aliquote di campione "bianco" fortificate a tre livelli di concentrazione: 20, 50 e 100 ppb, preparate in triplicato per tre giorni.

#### **3.1.3.5      *Quantificazione dei campioni***

Per effettuare la quantificazione degli analiti è stata costruita una curva di calibrazione in matrice per ogni giorno di analisi (come descritto nel *paragrafo 5.1.3.1* relativo alla validazione del metodo). La curva è stata costruita correlando le concentrazioni degli analiti con il rapporto tra i punti area degli stessi e quelli dei loro standard interni marcati.

Si è scelto di utilizzare standard interni marcati per l'AFLAB1C13, DONC13, FB1C13, OTAC13, ZEAC13; per quanto riguarda le altre aflatossine, per effettuare la quantificazione, è stato preso come riferimento lo standard marcato dell' AFLAB1C13, poiché considerato rappresentativo anche per la B2, G1 e G2 in virtù delle caratteristiche chimiche molto simili; lo stesso approccio è stato applicato nei confronti della FB2, per la quale è stato utilizzato lo standard marcato della FB1C13.

Per la quantificazione si è considerata la transizione ione precursore-ione prodotto primario.



#### **3.1.3.6            *Valutazione della soppressione ionica della matrice***

La soppressione ionica si verifica in tutti i casi in cui la matrice interferisce con il processo di ionizzazione dell'analita, inducendo errori nella quantificazione di quest'ultimo.

Per la valutazione della soppressione ionica della matrice sono stati messi a confronto i risultati ottenuti da fortificazioni note di campioni "bianchi" e di campioni non "bianchi" e di fortificazioni eseguite direttamente in solvente.

## 3.2 FORMAGGIO

### 3.2.1 MATERIALI E ATTREZZATURE DA UTILIZZARE

#### 3.2.1.1 UPLC-MS/MS

Per l'analisi dei campioni in esame è stata utilizzata la stessa strumentazione riportata *paragrafo 5.1.1.1*.

#### 3.2.1.2 *Altri materiali e attrezzature utilizzate*

Durante la preparazione dei campioni sono state utilizzate le apparecchiature ed i reagenti riportati nel *paragrafo 3.1.1.2*.

Per quanto riguarda gli standard utilizzati, oltre a AFLA B1, B2, G1, G2, FB1, FB2, DON e ZEA è stato utilizzato anche lo standard per l'aflatossina M1 in quanto caratteristica del latte e dei derivati lattiero-caseari, nonché l'unica presente all'interno della normativa Regolamento 1881/2006.

- ✓ AFLAM1: Aflatoxin M1, soluzione 10 µg/ml in aceto nitrile (Supelco, Bellafonte, USA);

Non sono stati utilizzati standard interni marcati per l'analisi dei campioni di formaggio.

- ✓ Filtri per siringa Millex<sup>®</sup> HN (NYLON) 0,45 µm (Millipore Corporation, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland).

### 3.2.1.3 Campioni

I campioni di formaggio su cui è stato messo a punto e validato il metodo sono stati ricavati da formaggio Asiago D.O.P. e Parmigiano Reggiano D.O.P. acquistato presso la grande distribuzione mentre Cacioricotta e Toma sono stati acquistati presso piccole aziende a produzione artigianale (Tabella 3.8).

L'Asiago D.O.P. appartiene alla tipologia di formaggi semi-cotti, stagionato per 20 giorni circa ([www.asiagocheese.it](http://www.asiagocheese.it)).

Il Parmigiano Reggiano D.O.P. appartiene alla tipologia di formaggi a pasta dura e dalla lunga stagionatura (18, 22, 30 mesi) ([www.parmigianoreggiano.it](http://www.parmigianoreggiano.it)), in questo caso è stata presa in considerazione una stagionatura di 22 mesi.

Il Cacioricotta è un formaggio a pasta cruda e semidura, stagionato (maturazione breve - media) in media 20 – 40 giorni ([www.cacioricotta.it](http://www.cacioricotta.it)).

La Toma è un formaggio a pasta semicotta e semidura, stagionato (maturazione breve – media) minimo 15 - 60 giorni ([www.formaggio.it](http://www.formaggio.it)) ([www.fao.org/](http://www.fao.org/)).

**Tabella 3.8. Campioni di formaggio.**

FORMAGGIO	
#1	Asiago D.O.P.
#2	Parmigiano Reggiano D.O.P.
#3	Cacioricotta
#4	Cacioricotta
#5	Toma
#6	Toma
#7	Toma
#8	Toma

### **3.2.2 MODALITÀ PER L'ESECUZIONE DELLA PROVA**

#### **3.2.2.1 Preparazione delle soluzioni standard**

Le soluzioni standard *Stock solutions* utilizzate per la preparazione dei QC (Quality Control) e dei campioni per la calibrazione della retta di ciascun analita sono state preparate in accordo con la procedura riportata nel *paragrafo 5.1.2.1*.

È stata inoltre preparata la

- ✓ *Stock solution*: Per l'AFLA M1 utilizzando lo standard commerciale a 10 ppm.
- ✓ *Standard AFLA M1*: 200 µl della *Stock solution* sono stati portati a 2 mL con una soluzione di acqua : metanolo = 1 : 1 allo 0,1% di acido formico ottenendo una soluzione con una concentrazione pari a 1 ppm.

Per l'estrazione e purificazione del campione sono state infine preparate le *Soluzione per l'estrazione* e *Soluzione per riprendere i campioni* secondo quanto riportato nel *paragrafo 5.1.2.1*.

#### **3.2.2.2 Estrazione del campione**

Per l'estrazione sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

1. sono stati pesati 5 g di campione, sminuzzati con una spatola, posti in un beaker;
2. addizionati 20 mL di *soluzione per l'estrazione*;
3. il campione è stato omogeneizzato attraverso l'utilizzo di un ultraturrax;
4. mantenuto su agitatore magnetico per 2 ore;
5. il contenuto del beaker è stato filtrato mediante filtri di carta e trasferito in una provetta falcon da 45 mL;

6. centrifugato ad una velocità di 4000 rpm per 20 minuti ad una temperatura di 25°C;
7. prelevati 6 mL di surnatante e trasferiti in falcon da 15 mL e addizionati 6 mL di esano; la provetta è stata agitata manualmente per circa 1 minuto;
8. centrifugato a 4000 rpm per 5 minuti a temperatura di 25°C, l'esano presente nella fase superiore della provetta è stato rimosso;
9. sono stati aggiunti al campione 4 g di sodio solfato anidro, mescolato e lasciato riposare al buio per 30 minuti;
10. il campione è stato filtrato, mediante filtro di carta, prelevato 1 mL e trasferito in una provetta di vetro;
11. la provetta è stata posizionata all'interno di un bagnomaria ad una temperatura inferiore a 40°C, e sotto flusso di azoto fino alla completa desolvatazione;
12. l'essiccato è stato ripreso con 1 mL di *soluzione per riprendere il campione* e agitato meccanicamente;
13. il campione è stato filtrato mediante filtri a farfalla in nylon e trasferito in vial per l'analisi in UPLC-MS/MS.

#### **3.2.2.3 Condizioni strumentali – Cromatografia liquida**

Le analisi sono state eseguite in condizioni programmate secondo le impostazioni del paragrafo 3.1.2.2.1 (Tabella 3.4)

#### **3.2.2.4 Condizioni strumentali – spettrometria di massa**

La modalità di ionizzazione utilizzata per ogni composto da analizzare è stata l'elettrospray positivo (ESI<sup>+</sup>).

Lo strumento ha operato in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring), osservando due transizioni per ognuno degli analiti target e per i relativi standard interni.

I valori di massa/carica degli ioni monitorati, i voltaggi e le energie di collisione sono riportate nel *paragrafo 3.1.2.3* e nella Tabella 3.5, fatta eccezione per l'AFLA M1 i cui parametri sono riportati nella Tabella 3.9.

**Tabella 3.9. Parametri strumentali MS-MS.**

Analita	Ione precursore (m/z)	Ione prodotto (m/z)	Cone Voltage (kV)	Collision Energy (eV)
AFLA M1	329,10	128,00	26	20
		156,00	26	10

### 3.2.3 VALIDAZIONE DEL METODO

Per procedere con la validazione del metodo è stato necessario individuare un campione che non contenesse originariamente le micotossine oggetto di analisi (campione “bianco”). Dall’analisi dei primi campioni di formaggio Asiago si è appurata l’assenza di tali analiti ed è stato quindi individuato nella matrice di Asiago D.O.P. il campione bianco utile per procedere nella validazione del metodo.

#### 3.2.3.1 Linearità

Per verificare la linearità del metodo è stata costruita una curva di calibrazione per ciascuna micotossina, ottenuta fortificando il campione “bianco” a cinque livelli di concentrazione come schematizzato nella tabella nella pagina successiva (Tabella 3.10). I campioni sono stati infine estratti ed iniettati nel sistema LC-MS/MS.

**Tabella 6.10. Schema per la fortificazione dei campioni.**

Concentrazione (ppb)	Working solution AFLA M1 (µl)	Working solution mix 9 (µl)
0	0	0
5	25	25
10	50	50
20	100	100
50	250	250
100	500	500

### **3.2.3.2 Specificità**

La specificità è stata calcolata analizzando 12 campioni "bianchi" di formaggio e valutando la presenza di segnali interferenti ai tempi di ritenzione specifici per ciascuna micotossina.

### **3.2.3.3 Sensibilità - Limite di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ)**

Utilizzando la retta di calibrazione, sono stati calcolati anche il limite di determinazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ). Il LOD non è altro che la concentrazione minima dell'analita in grado di produrre un segnale significativamente diverso da quello prodotto in un campione "bianco", quindi corrisponde ad un rapporto segnale/rumore (s/n ratio) pari rispettivamente a 3. Il LOQ, invece, è stato calcolato come il punto più basso della curva di calibrazione di cui sono stati ottenuti valori di precisione ed esattezza accettabili.

#### **3.2.3.4    *Esattezza e precisione***

Per calcolare l'esattezza e la precisione del metodo sono state processate aliquote di campione "bianco" fortificate a tre livelli di concentrazione: 10, 20 e 50 ppb. Le analisi sono state ripetute in triplicato per tre giorni ed ogni giorno sono state costruite delle curve nuove per valutare la ripetibilità delle analisi.

#### **3.2.3.5    *Quantificazione dei campioni***

Per effettuare la quantificazione degli analiti è stata costruita una curva di calibrazione in matrice per ogni giorno di analisi (come descritto nel *paragrafo 5.2.3.1* relativo alla validazione del metodo). La curva è stata costruita correlando le concentrazioni degli analiti con il rapporto tra i punti area degli stessi e quelli dei loro standard interni marcati.

Per la quantificazione si è considerata la transizione ione precursore-ione prodotto primario

#### **3.2.3.6    *Valutazione della soppressione ionica della matrice***

Per la valutazione della soppressione ionica della matrice sono stati messi a confronto i risultati ottenuti da campioni fortificati a concentrazioni note prima della processazione, con quelli ricavati dall'analisi di una retta di taratura preparata in solvente alle stesse concentrazioni e quelli di campioni "bianchi" fortificati prima dell'analisi strumentale.



## 4. RISULTATI E DISCUSSIONI

---

### 4.1 PET FOOD

#### 4.1.1 MESSA A PUNTO DEL METODO

##### 4.1.1.1 *Condizioni strumentali - cromatografia liquida*

Sono state prese in considerazione alcune pubblicazioni presenti in letteratura riguardanti la determinazione contemporanea di diverse micotossine mediante l'utilizzo della cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa, precisamente: Sulyok *et al.* (Sulyok *et al.* 2006); Sulyok *et al.* (Sulyok *et al.* 2010); Lattanzio *et al.* (Lattanzio *et al.* 2011); Jackson *et al.* (Jackson *et al.* 2012); Soleimany *et al.* (Soleimany *et al.* 2012). In tutti questi lavori sono state utilizzate colonne C18, pertanto si è deciso di equipaggiarsi di una colonna con la medesima fase stazionaria; nello specifico ci si è avvalsi di una Waters Acquity UPLC® BEH C18 (1.7 µm, 2,1 x 50 mm), abbinata ad una precolonna della stessa fase.

Consultando i lavori degli autori sopra citati sono stati testati diversi solventi e gradienti cromatografici al fine di trovare le condizioni ottimali per la separazione delle molecole. La notevole difficoltà nello scegliere le condizioni cromatografiche ottimali nell'ambito di una analisi multi residuale è dipesa dalla diversità chimico-strutturale delle molecole in esame; l'accentuata polarità delle FB1 e FB2, ad esempio, in forte contrasto con il comportamento apolare del DON ha influito in maniera sostanziale sulla scelta finale riportata nel paragrafo relativo ai metodi per l'esecuzione della prova (*paragrafo 5.1.2*).

Addizioni, in percentuali diverse, di acido formico oppure di ammonio acetato nei solventi quali acqua, metanolo e acetonitrile, sono state messe a confronto al fine migliorare la ionizzazione degli analiti a livello di spettrometro di massa (le condizioni ottimizzate sono riportate nel *paragrafo 5.1.2.1*).

#### **4.1.1.2 Condizioni strumentali - spettrometria di massa**

È stato messo a punto un metodo di massa MRM avvalendosi sia dei dati disponibili in letteratura (Sulyok *et al.* (Sulyok *et al.* 2006); Sulyok *et al.* (Sulyok *et al.* 2010) Lattanzio *et al.* (Lattanzio *et al.* 2011) 2011; Jackson *et al.* (Jackson *et al.* 2012); Soleimany *et al.* (Solemany *et al.* 2012) sia dai valori emersi dall'auto-tune dello strumento. Sono state infatti effettuate infusioni dirette nello spettrometro di massa di soluzioni alla concentrazione di 1 ppm in acqua:metanolo = 1 : 1 con 0,1% di acido formico di ciascun analita. I parametri ottenuti sono risultati in linea con quelli riportati in letteratura, tranne che per i parametri relativi al DON e allo ZEA, per i quali si è verificata una maggiore risposta strumentale nei confronti di transizioni diverse rispetto a quelle riportate dagli autori citati, i parametri ottimizzati sono quelli riportati nel paragrafo relativo ai metodi per l'esecuzione della prova (*paragrafo 5.1.2*).

Nella maggior parte dei lavori presi in esame la modalità di ionizzazione utilizzate per quasi tutti gli analiti è stata l'ESI<sup>+</sup>, lo ZEA invece è risultato più facilmente rilevabile in ESI<sup>-</sup>. Alla luce di questo si è deciso di effettuare numerose prove a diversi voltaggi del cono, constatando che la polarità di ionizzazione ottimale per tutte le molecole, compreso lo ZEA, è risultata essere quella positiva.

#### **4.1.1.3 Estrazione dei campioni**

Gli articoli precedentemente citati prendono in considerazione la presenza di micotossine in cereali e matrici alimentari a base di cereali, nessuno in

petfood completi. Questo aspetto è stato, invece, considerato nella pubblicazione di Pagliuca *et al.* (Pagliuca *et al.* 2011), che ha presentato un metodo per la determinazione della FB1 e FB2 all'interno di tali matrici.

Per l'estrazione è stata inizialmente considerata la metodica descritta prima da Sulyok *et al.* (Sulyok *et al.* 2006) e poi da Soleimany *et al.* (Soleimany *et al.* 2012), i quali entrambi prevedono l'aggiunta di una soluzione composta da acetonitrile : acqua : acido acetico = 79:20:1 al campione che viene mantenuto in agitazione per 60 minuti. Successivamente i campioni sono stati centrifugati e 500 µl di surnatante sono stati prelevati e diluiti con la stessa soluzione utilizzata per l'estrazione. Prima di essere iniettati nel sistema cromatografico, gli estratti sono stati filtrati.

È stato poi effettuato un confronto con il metodo descritto da Jackson *et al.* (Jackson *et al.* 2012) che utilizza l'acido formico al posto dell'acido acetico per la soluzione di estrazione e porta a secco i 500 µl di surnatante; questo metodo prevede, inoltre, di riprendere i campioni con una soluzione composta da acqua : aceto nitrile : acido formico = 95:5:0,1 con 10 mM di ammonio acetato. Secondo questo autore, infatti, ricostituire i campioni con una soluzione ad alta percentuale di fase inorganica aumenta il tempo di ritenzione degli analiti che escono per primi dal sistema cromatografico e ne migliora l'aspetto dei picchi, che risultano più stretti. Le rispettive soluzioni risultate ottimali per l'analisi sono quelle riportate nel paragrafo relativo ai metodi per l'esecuzione della prova (*paragrafo 5.1.2*).

Inoltre sono state effettuate prove mantenendo su agitatore magnetico i campioni per tempi diversi, rispettivamente 30 minuti, 1 ora (Soleimany *et al.* 2012), 2 ore e 18 ore (Jackson *et al.* 2012); confrontando i risultati ottenuti da ciascuna prova è stato verificato che i campioni mantenuti su agitatore per 1 ora hanno mostrato un miglioramento del segnale (rispetto ai 30 minuti) con recuperi migliori, mentre quelli mantenuti per 18 ore hanno mostrato un peggioramento del segnale e conseguenti recuperi

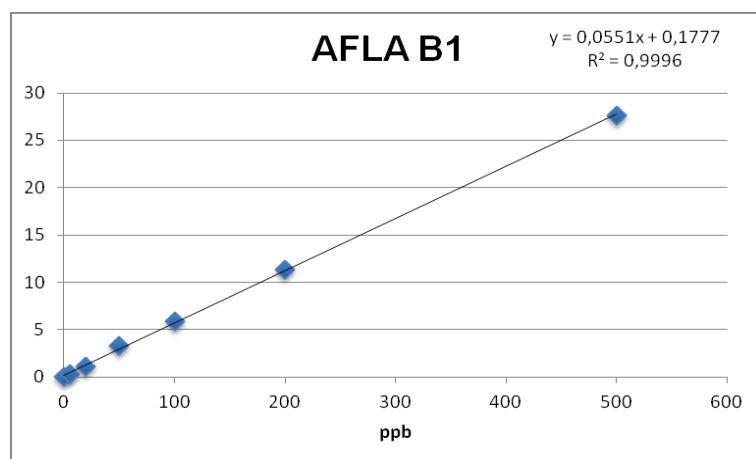
inferiori. Si è quindi optato per un tempo di agitazione magnetica pari a 2 ore (*paragrafo 5.1.2*).

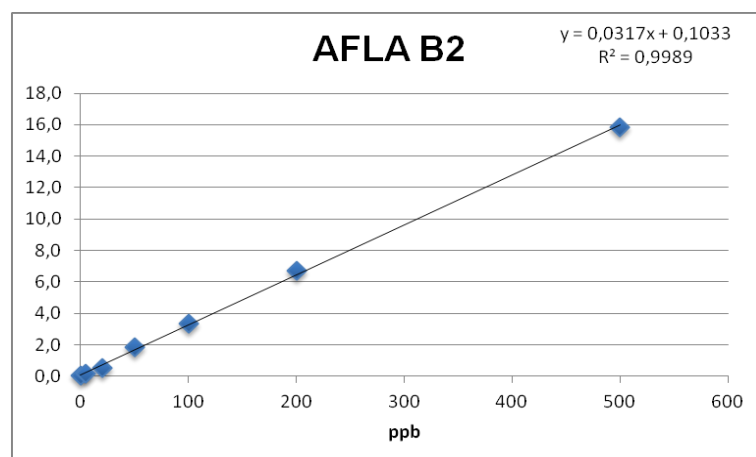
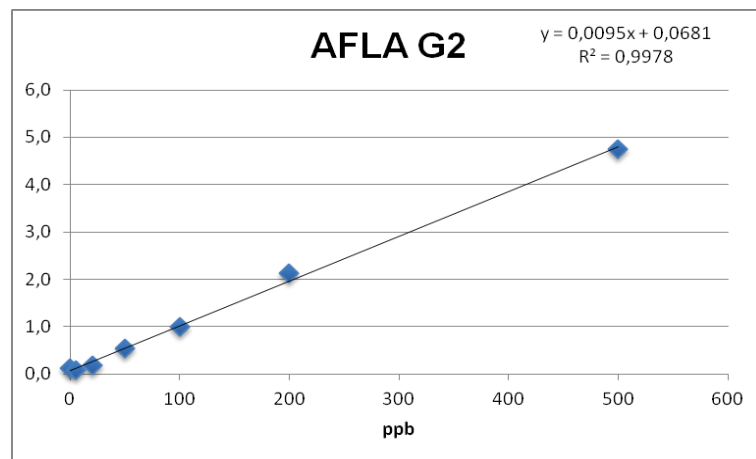
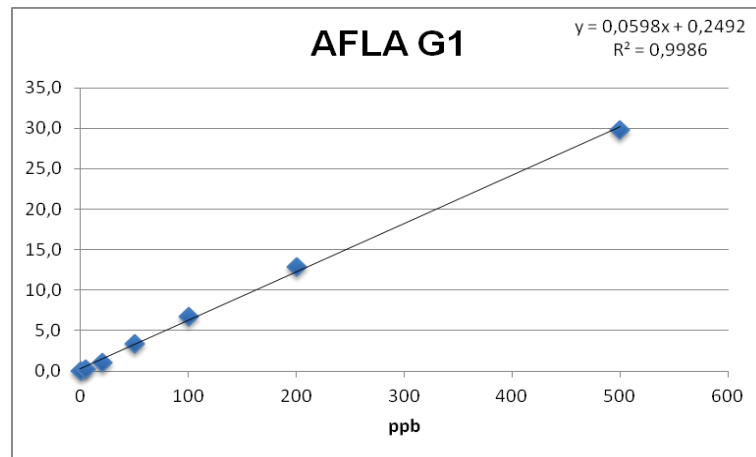
Infine, prendendo spunto dal lavoro di Sulyok *et al.* (Sulyok *et al.* 2006) che propone soluzioni di estrazione con una più alta percentuale di fase inorganica, si è deciso di mettere a confronto diverse soluzioni composte dal 20% e dal 25% di acqua. È stato verificato che la soluzione al 74% di acetonitrile, 25% di acqua e 1% di acido acetico permette recuperi molto più alti di fumonisine, zearalenone e ocratossina rispetto alla soluzione di estrazione usata precedentemente (*paragrafo 5.1.2.1*).

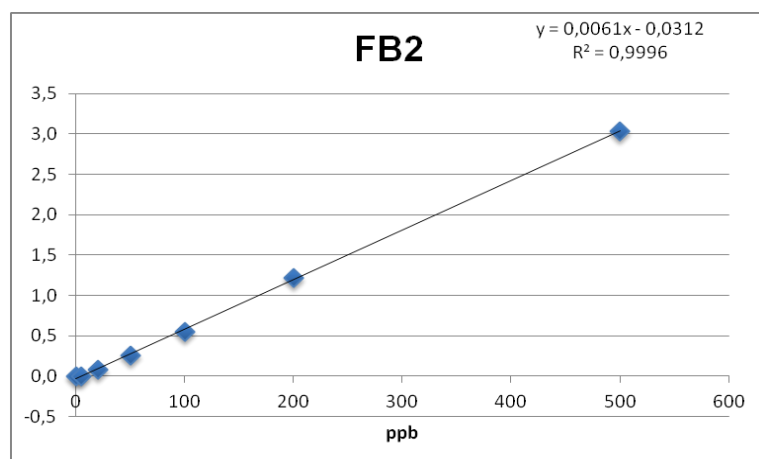
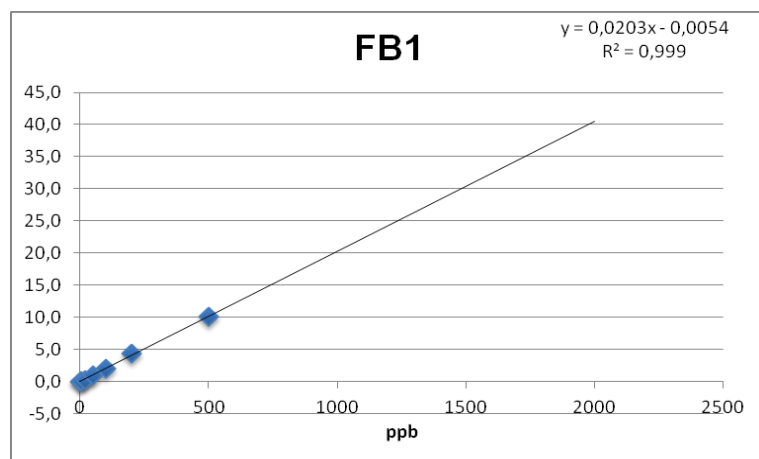
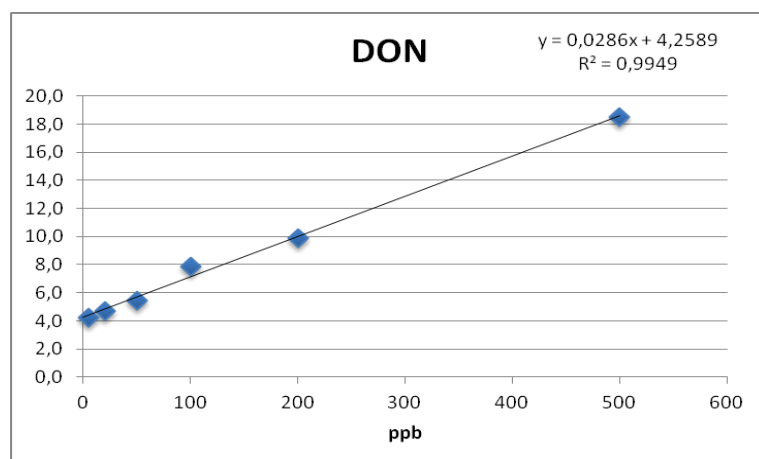
## 4.1.2 VALIDAZIONE DEL METODO

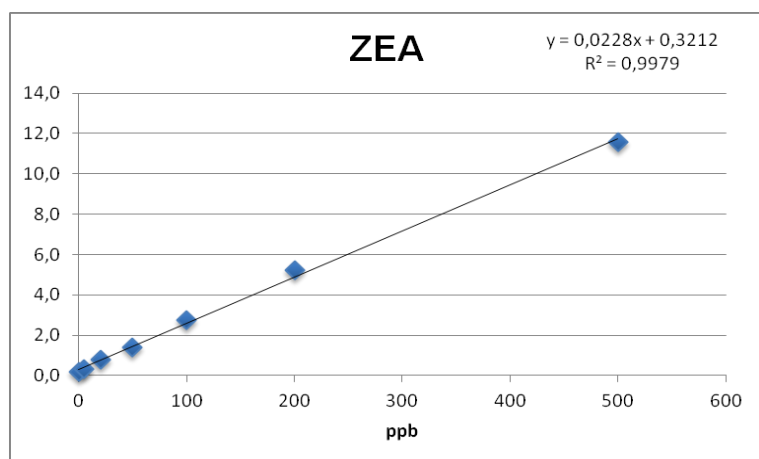
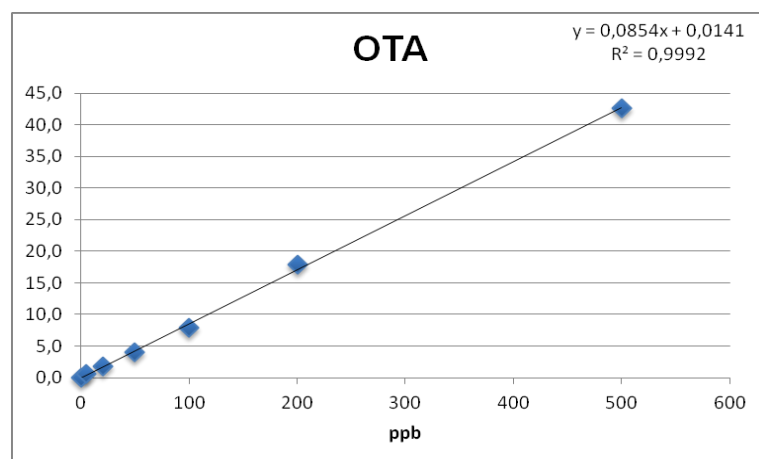
### 4.1.2.1 Linearità

La costruzione delle curve di calibrazione (Figura 2), mediante l'utilizzo di campioni fortificati a concentrazioni note (come riportato nel *paragrafo 5.1.3.1*) ha permesso di evidenziare un'ottima linearità del metodo, in quanto il valore di  $R^2$  è risultato, per tutti i composti, maggiore di 0,99 nonostante l'ampio range di concentrazioni scelte per costruire le curve (come mostrato nei grafici in Figura 4.1). In particolare per tutti i composti si è scelto di usare un range da 0 a 500 ppb mentre per la FUMO B<sub>1</sub> la retta raggiunge un punto massimo di 2000 ppb. Di seguito vengono riportate tutte le rette di taratura ottenute per ogni analita.









**Figura 4.2. Curve di calibrazione.**

#### **4.1.2.2 Specificità**

Non avendo disponibilità di campioni totalmente privi di analiti, è stato difficoltoso valutare la specificità del metodo.

Questa è stata verificata constatando la presenza di un picco cromatografico, avente lo stesso tempo di ritenzione del corrispondente standard, dopo fortificazione a concentrazioni crescenti dei campioni risultati meno contaminati, come descritto nel *paragrafo 5.1.3* (Figura 4.2).

#### **4.1.2.3 Sensibilità - Limite di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ)**

La sensibilità del metodo è stata valutata fortificando il campione “bianco” a concentrazioni sempre minori, determinando così il limite di determinazione (LOD). Per quanto riguarda il limite di quantificazione (LOQ) è stato considerato il punto più basso della retta come descritto nel *paragrafo 3.1.3.3*.

In particolare, per il LOQ relativo allo ZEA è stato individuato un valori più alti rispetto agli altri analiti a causa di un elevato rapporto segnale/rumore di fondo nelle transizioni utilizzate.

I valori ottenuti sono riportati nella seguente Tabella 4.1.



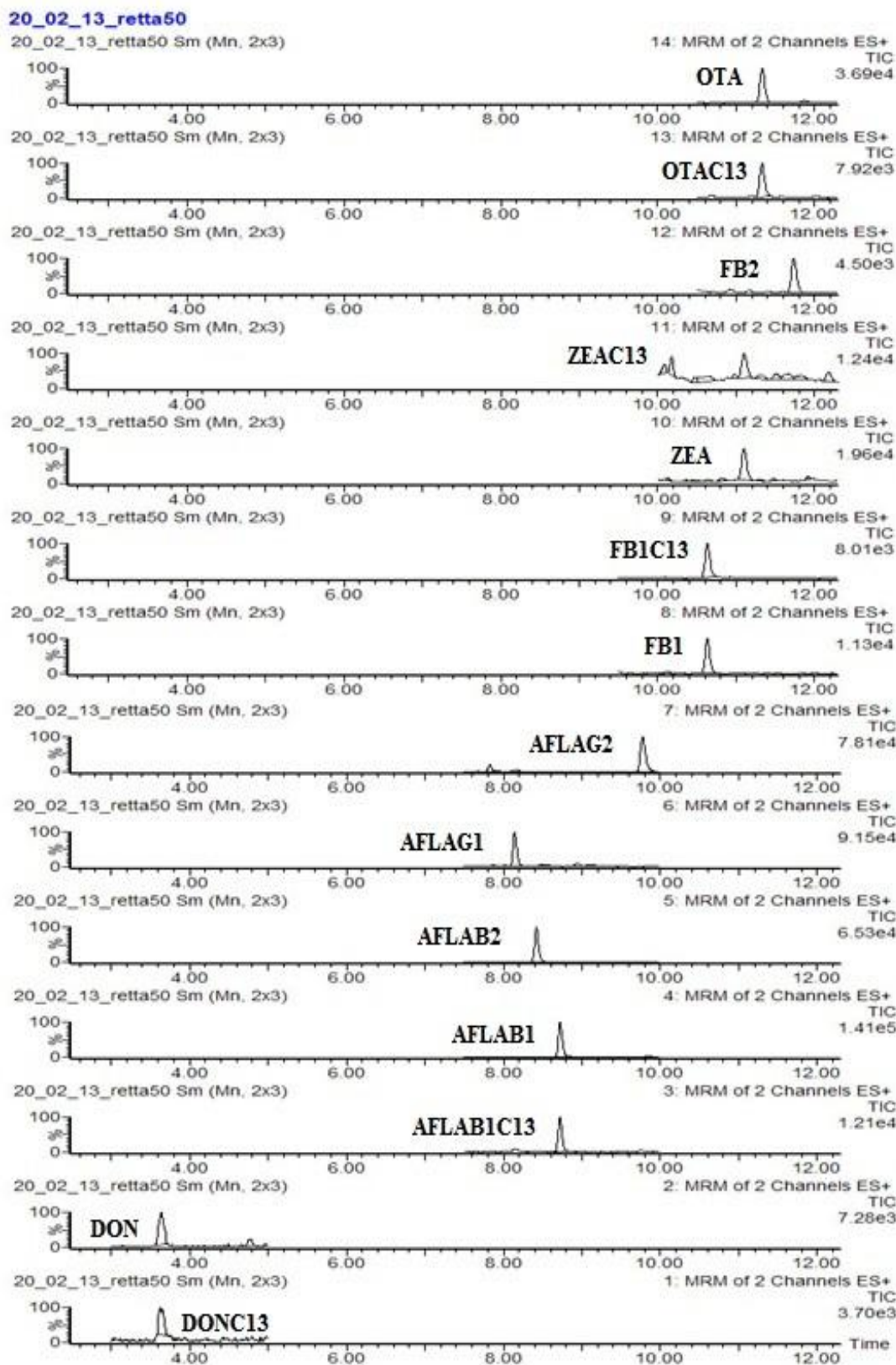


Figura 4.3. Cromatogramma relativo ad un campione bianco fortificato.

**Tabella 4.7. Valori relativi al limite di quantificazione (LOQ) e limite di detenzione (LOD).**

Nome	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
AFLA B1	0,5	5
AFLA B2	0,5	5
AFLA G1	2	5
AFLA G2	2	5
DON	1	5
FB1	1	5
FB2	2	5
OTA	2	5
ZEA	5	10

#### **4.1.2.4 Esattezza e precisione**

I valori di esattezza e precisione ottenuti secondo quanto nel *paragrafo 5.1.3.4*, sono soddisfacenti, come si può verificare dai dati riportati nella tabella sottostante (Tabella 4.2). I dati, inoltre, si mostrano in linea con quelli pubblicati da altri autori, come ad esempio Sulyok *et al.* (Sulyok *et al.* 2006), Sulyok *et al.* (Sulyok *et al.* 2010), Lattanzio *et al.* (Lattanzio *et al.* 2011), Jackson *et al.* (Jackson *et al.* 2012) e Soleimany *et al.* (Soleimany *et al.* 2012).

**Tabella 4.8. Valori di esattezza e precisione ottenuti.**

<b>AFLA B1</b>	<b>Precisione (%)</b>	<b>Esattezza (%)</b>
20 ppb	12,2	- 2,5
50 ppb	10,6	- 4,2
100 ppb	9,4	5,1
<b>AFLA B2</b>	<b>Precisione (%)</b>	<b>Esattezza (%)</b>
20 ppb	26,4	1,6
50 ppb	14,2	- 2,2
100 ppb	8,7	6,7
<b>AFLA G1</b>	<b>Precisione (%)</b>	<b>Esattezza (%)</b>
20 ppb	25,5	8,4
50 ppb	18,4	- 2,6
100 ppb	19,2	17,4
<b>AFLA G2</b>	<b>Precisione (%)</b>	<b>Esattezza (%)</b>
20 ppb	18,4	4,4
50 ppb	17,8	- 2,4
100 ppb	18,9	16,8
<b>DON</b>	<b>Precisione (%)</b>	<b>Esattezza (%)</b>
20 ppb	26,3	10,7
50 ppb	15,9	- 2,7
100 ppb	22,0	6,6
<b>FB1</b>	<b>Precisione (%)</b>	<b>Esattezza (%)</b>
20 ppb	20,8	-1,9
50 ppb	21,8	4,4
100 ppb	14,5	- 2,1
<b>FB2</b>	<b>Precisione (%)</b>	<b>Esattezza (%)</b>
20 ppb	23,9	-1,9
50 ppb	6,4	1,5
100 ppb	6,7	2,0
<b>OTA</b>	<b>Precisione (%)</b>	<b>Esattezza (%)</b>
20 ppb	8,0	6,7
50 ppb	13,5	12,6
100 ppb	11,0	9,6
<b>ZEA</b>	<b>Precisione (%)</b>	<b>Esattezza (%)</b>
20 ppb	19,4	8,9
50 ppb	17,4	5,5
100 ppb	12,8	10,1

#### 4.1.2.5 Campioni

Le concentrazioni di micotossine determinate nei campioni sono riportati nella Tabella 4.3 (campioni *Standard*) e nella Tabella 4.4 (campioni *Premium*).

**Tabella 3.9. Campioni *Standard* (valori espressi in µg/kg).**

	AFLA B1	AFLA B2	AFLA G1	AFLA G2	DON	FB1	FB2	OTA	ZEA
#1	Tr.	-	-	Tr.	127,5	453,4	100,4	36,1	-
#2	Tr.	-	-	Tr.	47,7	164,6	70,0	19,3	Tr.
#3	-	-	-	-	102,5	384,8	88,6	23,7	Tr.
#4	-	-	-	Tr.	100,5	310,1	65,1	11,0	42,4
#5	-	Tr.	*	-	13,4	Tr.	-	11,5	-
#6	Tr.	Tr.	-	-	169,4	685,4	143,2	16,7	12,5
#7	-	Tr.	-	Tr.	33,5	10,1	10,0	29,6	Tr.
#8	Tr.	-	-	Tr.	130,3	453,6	114,5	20,2	-
#9	Tr.	-	-	Tr.	15,0	1147,4	388,1	40,1	Tr.
#10	-	-	-	-	236,0	22,5	-	16,4	-
#11	-	-	-	6,4	98,2	26,1	8,8	Tr.	12,1
#12	Tr.	-	-	Tr.	191,6	545,9	106,2	41,1	18,5
#13	-	Tr.	-	Tr.	114,8	638,7	141,9	18,2	-
#14	-	Tr.	-	Tr.	101,0	923,6	80,9	27,2	-
#15	Tr.	Tr.	-	-	78,2	1503,1	242,6	20,1	-
#16	Tr.	Tr.	-	-	215,0	414,7	111,3	30,5	-
#17	-	Tr.	-	-	281,2	529,5	161,4	35,6	Tr.
#18	Tr.	-	-	13,2	23,0	238,8	223,7	16,7	-
#19	Tr.	-	-	Tr.	26,9	1450,2	199,2	27,3	Tr.
#20	-	Tr.	-	-	172,5	417,3	32,1	-	-
#21	-	Tr.	-	-	59,3	391,2	57,2	6,2	-
#22	-	-	-	-	29,1	59,4	14,8	8,7	-
#23	-	-	-	Tr.	71,8	26,6	21,7	23,1	11,0
#24	Tr.	Tr.	-	-	38,7	Tr.	Tr.	26,5	-

\* Tr. = tracce (LOD < concentrazione analita < LOQ).

**Tabella 4.4. Campioni *Premium* (valori espressi in µg/kg).**

	AFLA B1	AFLA B2	AFLA G1	AFLA G2	DON	FB1	FB2	OTA	ZEA
#26	-	Tr.	-	-	37,2	24,2	7,8	Tr.	-
#27	Tr.	Tr.	-	-	154,9	41,5	Tr.	5,8	-
#28	-	Tr.	Tr.	-	158,2	Tr.	23,6	40,2	22,5
#29	-	-	-	-	110,7	Tr.	Tr.	9,0	-
#30	Tr.	15,6	Tr.	-	51,1	142,4	49,8	11,0	30,3
#31	-	8,8	-	-	57,5	324,5	25,3	7,5	Tr.
#32	Tr.	-	-	Tr.	65,9	85,6	66,2	11,9	Tr.
#33	Tr.	Tr.	Tr.	-	40,0	46,5	Tr.	7,1	10,7
#34	-	-	-	5,7	16,4	78,3	28,2	Tr.	-
#35	-	Tr.	Tr.	Tr.	31,7	86,6	27,0	Tr.	Tr.
#36	-	Tr.	-	-	53,8	175,7	155,3	11,2	-
#37	Tr.	Tr.	-	-	135,7	Tr.	Tr.	32,1	26,9
#38	-	Tr.	Tr.	-	57,9	62,9	22,1	11,3	Tr.
#39	-	Tr.	Tr.	-	98,9	26,4	-	6,1	10,4
#40	-	-	-	-	43,1	129,6	84,0	16,5	11,9
#41	-	Tr.	Tr.	Tr.	13,6	59	14,6	Tr.	Tr.
#42	-	-	-	6,0	24,0	19,7	16,4	10,3	-
#43	-	Tr.	-	Tr.	41,1	51,5	8,0	8,7	Tr.
#44	-	Tr.	-	Tr.	246,5	15,1	Tr.	Tr.	Tr.
#45	-	Tr.	-	-	189,1	Tr.	-	20,4	14,0
#46	-	-	-	-	131,8	Tr.	Tr.	Tr.	Tr.
#47	-	Tr.	-	-	114,5	6	Tr.	5,3	Tr.
#48	-	-	-	Tr.	9,5	101,6	10,5	Tr.	Tr.
#49	-	Tr.	-	Tr.	66,8	46,1	Tr.	5,8	Tr.

\* Tr. = tracce ( $LOD < \text{concentrazione analita} < LOQ$ ).

Nella Tabella 4.5 sono stati riportati il numero di campioni positivi per tipo di micotossina.

**Tabella 4.5. Numero di campioni risultati positivi alla contaminazione.**

	STANDARD	PREMIUM
<b>DON</b>	24	24
<b>AFLA B1+B2+G1+G2</b>	2 (+19 in tracce)	4 (+ 17 in tracce)
<b>FB1+FB2</b>	22 (+2 in tracce)	20 (+4 in tracce)
<b>OTA</b>	22 (+1 in tracce)	17 (+7 in tracce)
<b>ZEA</b>	5 (+6 in tracce)	7 (+ 11 in tracce)

In particolare, il 100% campioni sono risultati positivi per quanto riguarda la presenza di DON, risultando la micotossina più diffusa in mangime secco per cane.

Solo nel 13% dei campioni è stato possibile quantificare la presenza di aflatossine poiché, nel restante 77% sono state riscontrate solamente tracce (concentrazione determinata superiore al LOQ) delle micotossine (Tabella 4.5);

Per quanto riguarda la presenza di OTA, il 98% dei campioni si è mostrato positivo alla micotossina, mentre lo ZEA è stato possibile quantificarlo solo nel 25% dei campioni, nel restante 35% sono state rilevate soltanto tracce.

Il 100% dei campioni analizzati inoltre si sono dimostrati positivi alla contaminazione da fumonisine (intesa come somma di FB1 e FB2).

Nella Tabella 4.6, in rosso è stato evidenziato il parametro più altro riscontrato nei campioni analizzati pari a 1.745,7 µg/Kg, che risulta essere inferiore al limite di legge pari a 5 mg/Kg.

E' possibile affermare, sulla base dei dati ottenuti, che il campione maggiormente contaminato risulta essere ampiamente al di sotto del limite di legge.

**Tabella 4.6. Somma delle concentrazioni di FB1 + FB2 nella categoria *Standard e Premium* espressi in µg/Kg (ppb).**

	STANDARD	PREMIUM	
	FB1+FB2	FB1+FB2	
#1	553,8	32,0	#26
#2	234,6	41,5	#27
#3	473,4	23,6	#28
#4	375,1	-	#29
#5	-	192,2	#30
#6	828,6	349,8	#31
#7	20,1	151,8	#32
#8	568,1	46,5	#33
#9	1.535,5	106,5	#34
#10	22,5	113,6	#35
#11	34,9	331,0	#36
#12	652,1	-	#37
#13	780,6	85,0	#38
#14	1.004,5	26,4	#39
#15	1.745,7	213,7	#40
#16	526,0	73,6	#41
#17	690,9	36,1	#42
#18	462,4	59,5	#43
#19	1.649,4	15,1	#44
#20	449,4	-	#45
#21	448,4	-	#46
#22	74,2	6,0	#47
#23	48,3	112,1	#48
#24	-	46,1	#49

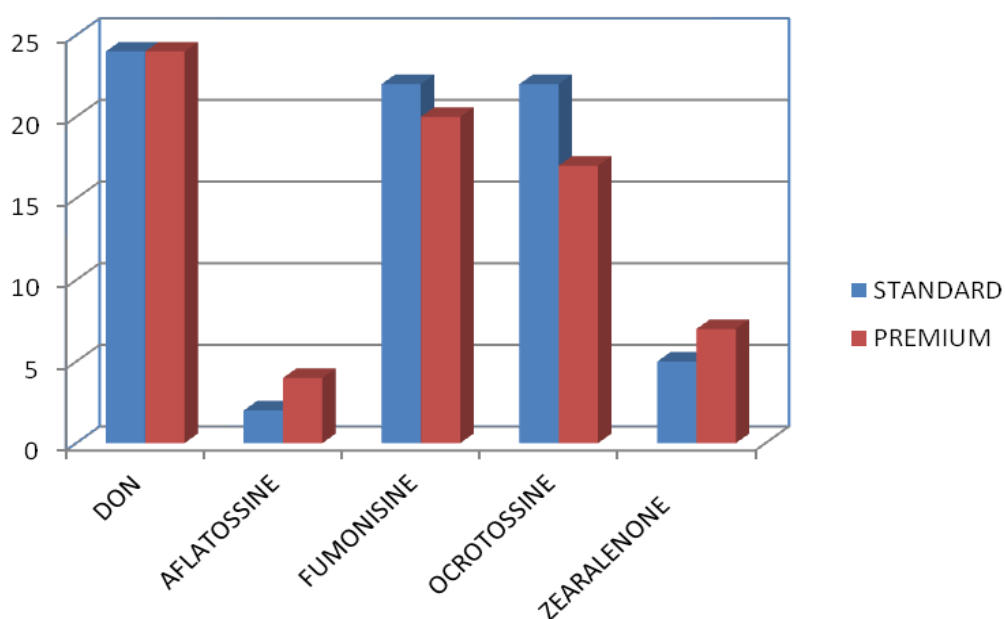
I valori relativi alla contaminazione da fumonisine confermano in parte quanto evidenziato da un precedente studio (Pagliuca *et al.* 2011) riguardante il monitoraggio di FB1 e FB2 in campioni di petfood disponibile sul mercato italiano; i dati riportati da Pagliuca *et al.* (Pagliuca *et al.* 2011) però riferiscono livelli di contaminazione decisamente più alti. La variabilità tra i risultati potrebbe essere imputabile ad un'annata agricola più favorevole allo sviluppo di muffe sulle derrate alimentari oppure ad una maggiore sensibilizzazione da parte dei produttori nei confronti delle problematiche che potrebbero scaturire dall'inclusione nel petfood di materie prime di scarsa qualità più o meno contaminate.

Bohm *et al* (Bohm *et al.* 2010) in uno studio nel 2010 confermano il problema della preponderante contaminazione da *Fusarium*-tossine in mangimi per cani commercializzati in Austria e prodotti all'interno dell'Unione Europea, evidenziando la presenza di DON, FUMO e ZEA rispettivamente nell'83%, 68% e 67% dei campioni analizzati.

Lo studio di Akinrinmade *et al.* (Akinrinmade e Akinrinde 2012) del 2012 invece affronta la problematica relativa alla contaminazione da aflatossine B1, B2, G1 e G2, in mangimi secchi per cani commercializzati in Nigeria, riscontrando positività nel 100% dei campioni analizzati e prevalenza di AFLAB1.

Nell'istogramma in Figura 4.3 viene rappresentata la distribuzione delle diverse micotossine nei campioni analizzati, distinguendo le due fasce *Standard* e *Premium*.





**Figura 4.3. Istogramma del numero di campioni, *standard* e *premium*, risultati positivi alla contaminazione e loro micotossine di riferimento**

Confrontando le due categorie di mangime si può affermare che il range di contaminazione per il DON è di 281,2 - 13,4 µg/Kg per la categoria *Standard* e 189,1 – 9,5 µg/Kg per quella *Premium*.

Per l'OTA il range di contaminazione è di 41,1 - 6,2 µg/Kg per la categoria *Standard* e 40,2 – 5,3 µg/Kg per quella *Premium*.

Per lo ZEA il range di contaminazione è di 42,4 – 12,1 µg/Kg per la categoria *Standard* e 26,9 – 10,4 µg/Kg per quella *Premium*.

Il range risulta estremamente ampio per le fumonisine: in particolare le concentrazioni di FB1 nella categoria *Standard* oscillano tra 1503,1 – 10,1 µg/Kg, mentre nella categoria *Premium* oscillano tra 324,5 – 6 µg/Kg.

Nelle Tabelle 4.7 e 4.8, rispettivamente riferite alle fasce *Standard* e *Premium*, sono riportate la media, la deviazione standard e la mediana delle quattro micotossine riscontrate con maggiore incidenza nei campioni.

**Tabella 4.7. Concentrazione di micotossine in campioni di mangime fascia *Standard* espresse in ppb ( $\mu\text{g/Kg}$ ).**

	DON	FB1	FB2	OTA
<b>Media</b>	103,2	490,8	113,4	23,0
<b>Dev.st</b>	75,1	432,8	92,6	9,9
<b>Mediana</b>	99,4	416,0	100,4	21,7

**Tabella 4.8. Concentrazione di micotossine in campioni di mangime fascia *Premium* espresse in ppb  $\mu\text{g/Kg}$ ).**

	DON	FB1	FB2	OTA
<b>Media</b>	81,3	80,2	38,5	13,0
<b>Dev.st</b>	61,7	74,7	40,4	9,7
<b>Mediana</b>	57,7	59,0	24,4	10,3

Appare evidente come le formulazioni standard risultino maggiormente contaminate rispetto ai prodotti premium (Figura 4.2).

In linea generale le differenze tra fascia *Standard* e *Premium* sono presumibilmente attribuibili alle diversità formulistiche delle due categorie di petfoods, riguardanti le componenti di carboidrati strutturali e non, nonché al differente grado qualitativo delle materie prime utilizzate.

## 4.2 FORMAGGIO

### 4.2.1 MESSA A PUNTO DEL METODO

#### 4.2.1.1 *Condizioni strumentali – Cromatografia liquida*

Per valutare le condizioni cromatografiche più idonee all'analisi sono stati presi in esame alcuni lavori bibliografici, tuttavia va precisato che in letteratura non vi è abbondanza di metodi multi residuali in UPLC-MS/MS per la determinazione di micotossine nella matrice formaggio.

Tra i lavori che sono stati considerati maggiormente vanno citati Kokkonen *et al.* (Kokkonen *et al.* 2005), Sorensen *et al.* (Sorensen e Elbaek 2005), Sulyok *et al.* (Sulyok *et al.* 2010), Oueslati *et al.* (Oueslati *et al.* 2012) Tanaka *et al.* (Tanaka *et al.* 2006).

Nei lavori presi in considerazione sono state utilizzate delle colonne C18, come quelle in nostro possesso, una Waters Acquity UPLC® BEH C18 (1.7 µm, 2,1 x 50 mm), abbinata ad una precolonna della stessa fase.

Sono state messe a confronto la metodica utilizzate per il petfood e quelle dei lavori sopra citati. Poiché gli analiti ricercati era gli stessi, ad eccezione della AFM1, si è provato ad applicare le medesime condizioni cromatografiche utilizzate per il pet-food (riportate nel *paragrafo 6.1.1.1*), controllando che il tempo di ritenzione e la simmetria del picco della AFM1 fossero ottimali.

#### 4.2.1.2 *Condizioni strumentali – Spettrometria di massa*

Le stesse considerazioni fatte per il perfood sono state applicate con successo alla matrice formaggio come riportato nel *paragrafo 6.1.1.2*.

L'AFLA M1 possiede una struttura chimica molto simile alle altre aflatossine (essendo un metabolita della AFLA B1) pertanto non è stato necessario apportare modifiche ai parametri strumentali, già impostati per il petfood.

Attraverso l'infusione diretta di AFLA M1 nello spettrometro di massa sono stati confrontati i parametri relativi alle transizioni della molecola con quelli presenti in letteratura.

I parametri ottimizzati sono riportati nel *paragrafo 3.2.2.4*.

#### **4.2.1.3 Estrazione del campione**

Per l'estrazione dei campioni di formaggio, inizialmente si è presa in considerazione la metodica utilizzata per il petfood (*paragrafo 3.1.2.2*), tuttavia la matrice formaggio presenta un contenuto lipidico capace di interferire con l'analisi strumentale e con l'estrazione degli analiti. Pertanto si è deciso di testare la capacità di alcuni solventi organici di estrarre la componente lipidica dal campione; la scelta del solvente è ricaduta sull'esano avendo mostrato in differenti prove maggiori recuperi degli analiti.

L'eliminazione della componente lipidica del campione non comporta perdita degli analiti in quanto le micotossine non presentano solubilità in esano; inoltre l'AFLA M1 possiede una scarsa affinità per la componente grassa del latte (Cattaneo *et al.* 2011).

Si è pertanto deciso di implementare la metodica estrattiva con un passaggio di purificazione in esano (passaggio n. 7 del *paragrafo 5.2.2.2*). Sono state eseguite alcune prove per determinare la quantità di esano ottimale da aggiungere all'estratto, confrontando rapporti di campione : esano = 1 : 1 (v:v) e 1 : 1,5 (v:v). Il rapporto 1 : 1 (v:v) si è mostrato più idoneo nel determinare maggiori recuperi degli analiti.

La matrice formaggio si è mostrata più complessa rispetto al petfood, soprattutto nella fase finale di estrazione; per ottenere un quantitativo di estratto congruo all'analisi in UPLC è stato necessario modificare l'ultimo passaggio della fase di estrazione (*paragrafo 3.2.2.2*):

- ✓ prelevato 1mL dalla fase inferiore, trasferiti in una provetta di vetro e desolvatati sotto flusso di azoto a bagnomaria ad una temperatura non superiore a 40°C (passaggio n. 10 del *paragrafo 3.2.2.2*).
- ✓ Il campione è stato quindi ripreso con 1mL della *soluzione per riprendere il campione*, filtrato mediante filtro a farfalla e trasferito in vial per l'analisi in UPLC (passaggio n. 12 del *paragrafo 3.2.2.2*).

Durante la fase di filtrazione (passaggio n. 12) si è più volte verificata una notevole resistenza nell'effettuare l'operazione a causa del particolato presente nel campione; per ovviare il problema sono state effettuate 3 prove di estrazione per valutare quale di queste potesse permettere di ottenere un filtrato limpido, sostituendo i filtri PTFE idrofobi con quelli HN in nylon (passaggio n. 13), aggiungendo un passaggio di filtrazione con filtri di carta (passaggio n. 5), e aumentando la velocità di centrifugazione a 6000 rpm per 20 minuti (passaggio n. 8).

Solo le prime prove hanno apportato un significativo miglioramento dell'estrazione.

Un altro inconveniente estrattivo si verificato successivamente alla filtrazione con filtro di carta e all'aggiunta dell'esano (passaggio n. 5 e 7), mostrando la separazione del campione in 3 fasi; quella superiore costituita da esano, quella intermedia da acetonitrile e quella inferiore da acqua. Per eliminare la componente acquosa, propria della matrice e della *soluzione per l'estrazione*, sono stati addizionati 4 g di sodio solfato anidro; questo ha reso il campione più omogeneo e ad agevolare la desolvatazione.

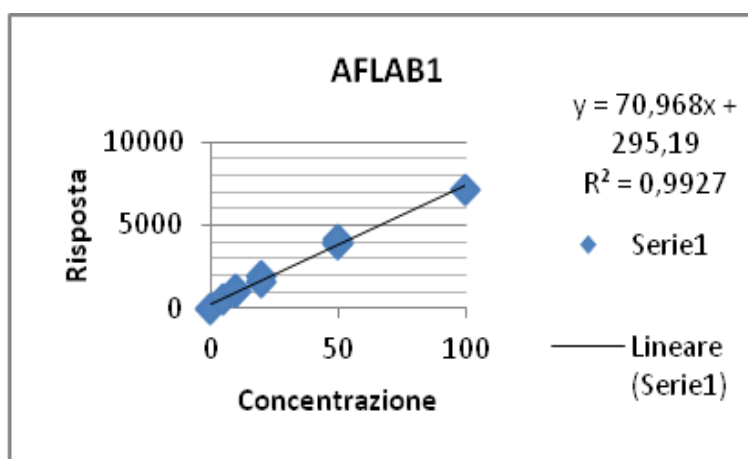
Per quanto riguarda *la soluzione per l'estrazione* e quella *per riprendere il campione*, essendosi esse dimostrate idonee anche per la matrice formaggio, valgono le stesse considerazioni effettuate nel *paragrafo 4.1.1.3*.

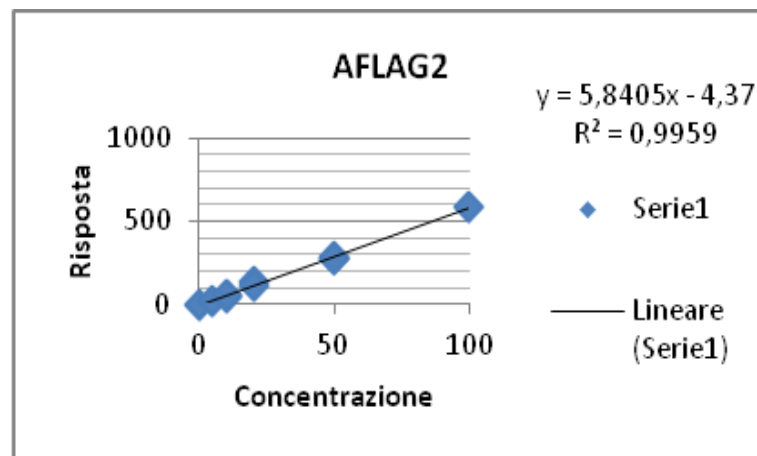
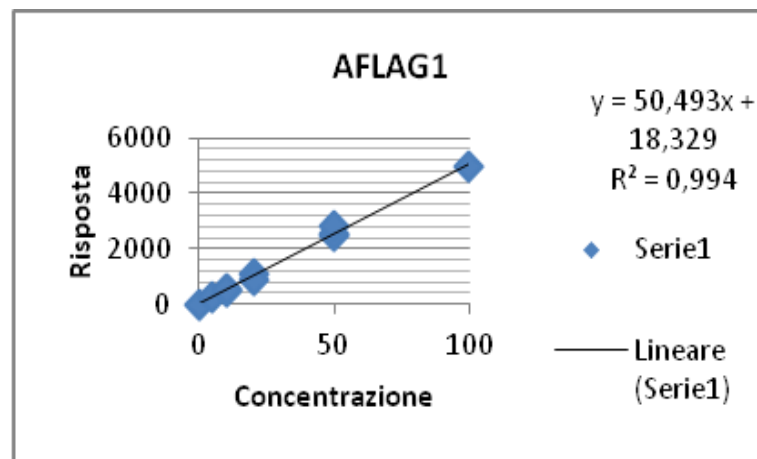
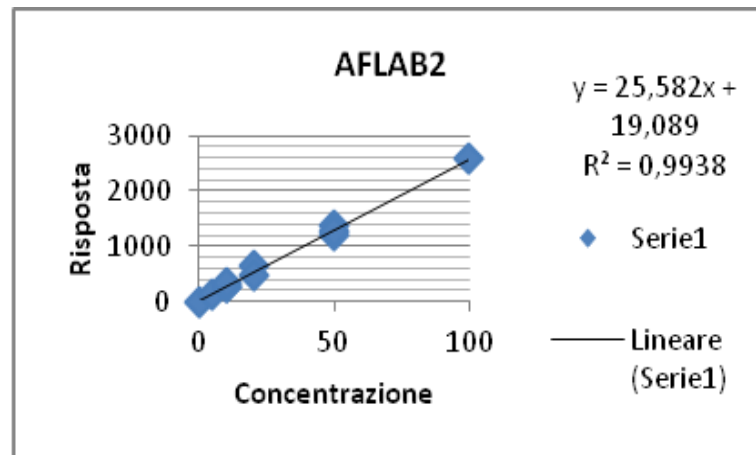
## 4.2.2 VALIDAZIONE DEL METODO

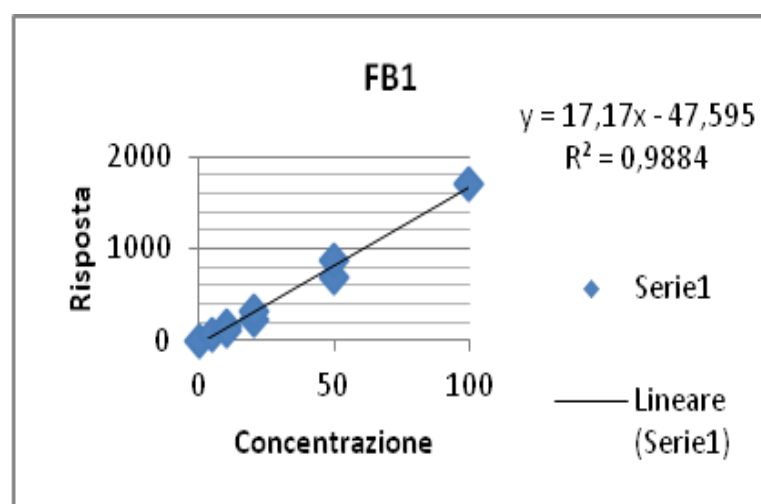
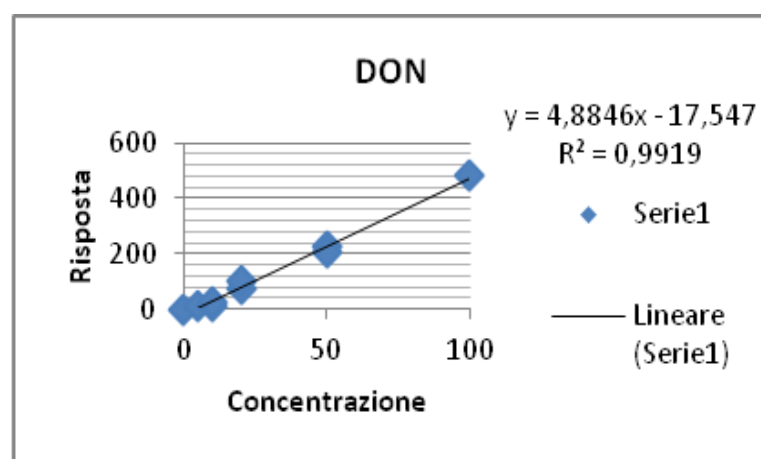
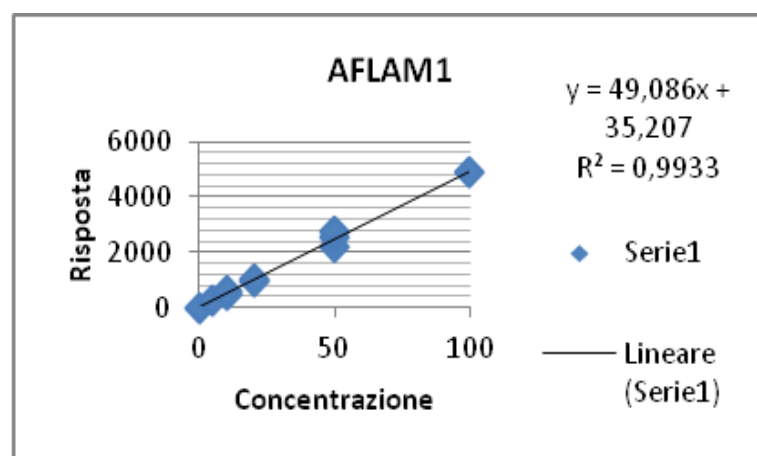
### 4.2.2.1 Linearità

La costruzione delle rette di taratura mediante l'utilizzo di campioni fortificati a concentrazioni note (come riportato nel *paragrafo 5.2.3.1*), ha permesso di evidenziare un'ottima linearità del metodo, in quanto il valore di R<sup>2</sup> è risultato maggiore di 0,99 per quasi tutti gli analiti ricercati; FB1, FB2 e ZEA hanno mostrato, invece, un valore di R<sup>2</sup> compreso tra 0,99 e 0,98.

Le concentrazioni utilizzate per la preparazione di tale retta sono comprese tra 0 a 100 ppb (*paragrafo 5.2.3.1*). Nella pagina seguente vengono riportate le curve di calibrazione di ciascun analita analizzato (Figura 4.3).









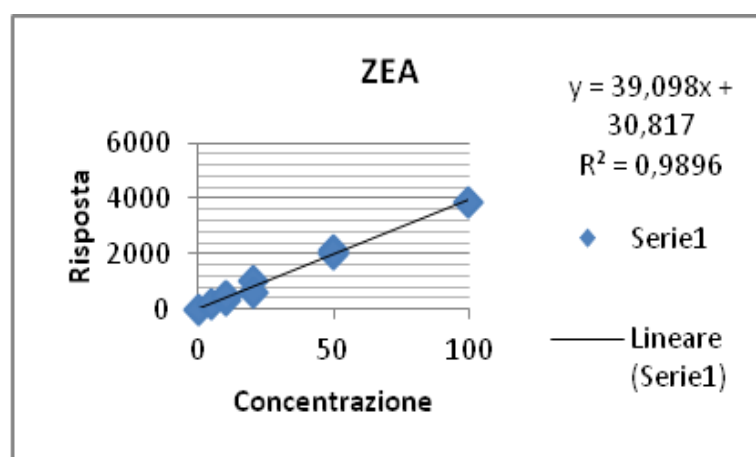
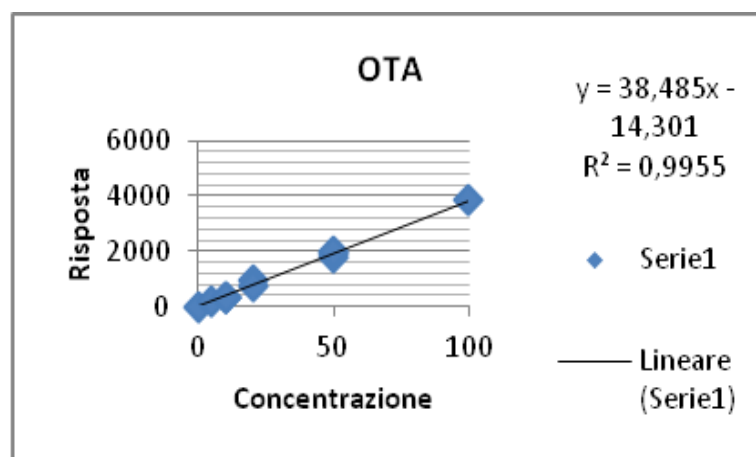
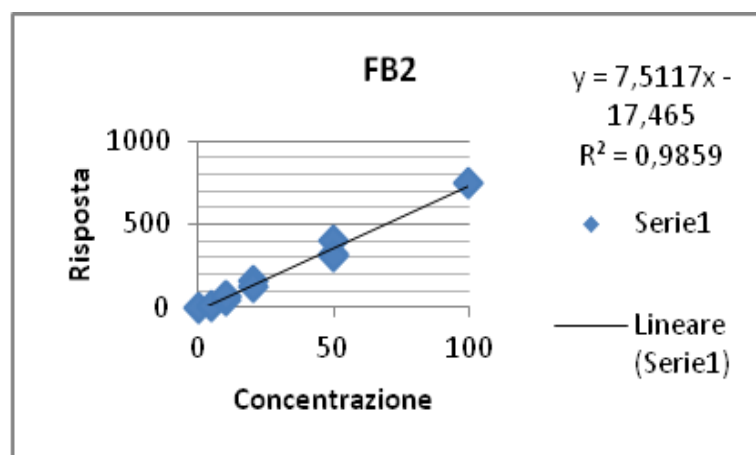


Figura 4.3. Curve di calibrazione.

#### 4.2.2.1 Specificità

L'analisi dei campioni di formaggio bianco (*paragrafo 5.2.3.3*), non hanno mostrato alcun tipo di interferenza con i picchi ricercati, mostrando quindi una buona specificità del test.

#### 4.2.2.2 Sensibilità – Limite di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ)

I valori ottenuti per quanto riguarda il limite di determinazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ), sono riportati nella Tabella 4.9.

Per il valore relativo al LOQ è stato scelto il punto di fortificazione più basso della retta di calibrazione, ovvero la concentrazione più bassa in grado di essere rilevata dalla strumentazione; i valori si sono mostrati in linea con i lavori presenti in letteratura (Kokkonen *et al.* 2005) ad eccezione dell'AFLAM1; infatti per questa micotossina la sensibilità del metodo è purtroppo insufficiente, tenendo in considerazione il limite di legge nel latte ed i fattori di concentrazione nei formaggi (riportati nel *paragrafo 1.2*).

Per il LOQ relativo allo ZEA è stato individuato un valore più alto rispetto agli altri analiti a causa di un elevato rapporto segnale/rumore di fondo nelle transizioni utilizzate.

**Tabella 10.9. Limite di determinazione (LOD) e limite di quantificazione (LOQ).**

Nome	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
DON	5	5
AFLAB1	1	5
AFLAB2	1	5
AFLAG1	1	5
AFLAG2	1	5
AFLAM1	0,5	5
FB1	1	5
FB2	1	5
ZEA	5	10
OTA	1	5

#### 4.2.2.3 Esattezza e precisione

I valori ottenuti di esattezza e precisione sono abbastanza soddisfacenti, come si può verificare dai dati riportati nella tabella sottostanti (Tabella 4.10); per lo ZEA alla concentrazione a 10ppb, tuttavia il metodo non è stato in grado di ottenere dei valori altrettanto validi.

**Tabella 11.10. Esattezza e precisione.**

AFB1	Precisione (%)	Esattezza (%)
10 ppb	25,7	-19,2
20 ppb	15,1	2,2
50 ppb	18,1	3,4
AFB2	Precisione (%)	Esattezza (%)
10 ppb	16,0	1,1
20 ppb	17,4	12,3
50 ppb	13,3	6,4
AFG1	Precisione (%)	Esattezza (%)
10 ppb	15,3	5,9
20 ppb	33,8	16,7
50 ppb	20,1	8,3
AFG2	Precisione (%)	Esattezza (%)
10 ppb	16,3	-6,6
20 ppb	15,6	11,3
50 ppb	11,6	1,1
AFM1	Precisione (%)	Esattezza (%)
10 ppb	18,4	-13,1
20 ppb	16,0	-2,1
50 ppb	9,1	2,7
FB1	Precisione (%)	Esattezza (%)
10 ppb	10,5	1,7
20 ppb	17,0	-5,6
50 ppb	15,0	1,7
DON	Precisione (%)	Esattezza (%)
10 ppb	25,7	-19,2
20 ppb	15,1	2,2
50 ppb	18,1	3,4

OTA	Precisione (%)	Esattezza (%)
10 ppb	19,1	-11,9
20 ppb	17,5	6,8
50 ppb	21,1	5,6
ZEA	Precisione (%)	Esattezza (%)
10 ppb	38,5	33,0
20 ppb	24,2	7,9
50 ppb	18,8	-0,5

#### **4.2.2.4 Campioni**

I campioni analizzati non hanno mostrato contaminazione da parte delle micotossine ricercate, inclusa l'AFLA M1 specifica dei prodotti lattiero caseari in virtù della sua affinità per la caseina (Cattaneo *et al.* 2011).

I risultati preliminari si sono mostrati quindi in linea con quelli di altri autori. Kokkenam nel suo lavoro non ha rilevato campioni positivi ad AFLA M1, B1, B2, G1, G2 e OTA in formaggi erborinati e a crosta fiorita; Cavaliere *et al.*, mettendo a confronto due metodiche estrattive per la determinazione di AFLA M1, non ha riscontrato positività nei campioni di formaggio D.O.P. quali Parmigiano Reggiano, Grana Padano e mozzarella.

#### **4.2.2.5 Applicabilità del metodo**

La diversa struttura chimico fisica degli analiti, la loro differente interazione con la matrice e l'assenza di standard interni marcati hanno fatto sì i risultati ottenuti dalla validazione in termini di esattezza, precisione e sensibilità per alcuni analiti siano migliorabili. Proprio per questo motivo è stato ritenuto poco utile confrontare le prestazioni di questo metodo con quelle richieste dal Reg. CE 401/2006 per i metodi ufficiali.

Nonostante ciò è stato deciso di usare il metodo riportato per l'analisi di differenti tipologie di formaggi al fine di valutare la sua applicabilità in termini tecnici a matrici effettivamente diverse. Infatti la consistenza e la composizione dei formaggi può differire in maniera considerevole ed incidere sulle varie fasi di estrazione.

## 5. CONCLUSIONI

---

### 5.1 PET FOOD

Le micotossine sono sostanze in grado di provocare effetti tossici negli animali, come ad esempio cancerogenicità epatica e renale, attività mutagena e teratogena e alterazioni ormonali (Gajecka *et al.* 2013).

Considerato le materie prime a forte rischio di micocontaminazione impiegate nella formulazione dei mangimi a base di cereali per animali da compagnia e la frequente contaminazione di questi ultimi (Pagliuca *et al.* 2011) (Bohm *et al.* 2010), l'Unione Europea suggerisce il limite massimo di fumonisine (dato dalla somma di FB1 + FB2) nei mangimi completi e complementari destinati all'alimentazione degli animali da compagnia (Raccomandazione CE 576/2006).

L'esigua presenza di lavori indirizzati alla ricerca di questa sostanze all'interno del petfood e la poca attenzione legislativa a riguardo induce a riflettere su quanta attenzione viene rivolta al benessere nutrizionale degli animali da compagnia.

Questo lavoro è stato effettuato per poter permettere un'analisi ad ampio raggio sulla contaminazione da parte di micotossine nel petfood, nonché mettere a punto una metodica analitica multi residuale su matrici complesse e poco studiate.

Il metodo proposto si è dimostrato rapido ed economico, poiché non prevede l'uso di colonnine ad immunoaffinità, semplice e con sensibilità ampiamente sufficiente considerando i limiti stabiliti dall'Unione Europea. Inoltre, trattandosi di un metodo multiresiduale per valutare la presenza

delle principali micotossine in matrici complesse quali il petfood, risulta essere uno strumento appropriato per lo studio di tali sostanze.

Nel loro insieme i risultati acquisiti dall'analisi preliminare di campioni in commercializzati in europa indicano una diffusa presenza di micotossine negli alimenti secchi per cani, tuttavia i livelli riscontrati per singolo analita sono conformi ai limiti previsti dalla legge.

Non si esclude quindi che l'attenzione scientifica possa portare a miglioramenti sia nel campo dell'analisi residuale sia in campo medico veterinario.

## 5.2 FORMAGGI

Le micotossine sono sostanze in grado di provocare effetti tossici sia nell'uomo che negli animali, come ad esempio cancerogenicità epatica e renale, attività mutagena e teratogena e alterazioni ormonali. Considerato che la Comunità Europea, attraverso i suoi regolamenti, ed in particolare con il Reg. 1831/2003, non prevede limiti normati sulla matrice casearia, questo lavoro tenta in qualche modo di proporre un metodo di valutazione relativamente rapido ed efficiente sulla ricerca multiresiduale di micotossine. Il lavoro ha mostrato discreti risultati dal punto di vista della linearità, sensibilità, specificità e dell'accuratezza ed una buona applicabilità tecnica a differenti tipi di formaggi.

Sicuramente il metodo non può che essere perfezionato, ma questo rappresenta un buon punto di partenza per sviluppare l'argomento, in modo particolare alla luce del fatto che in letteratura non sono presenti numerosi lavori sulla matrice considerata.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Akinrinmade J.F., Akinrinde A.S. (2012) "Aflatoxin status of some commercial dry dog foods in Ibadan, Nigeria"; *African Journal of Biotechnology*; 11(52): 11463-11467.

Battacone G., Nudda A. e Pulina G. (2010) "Effects of ochratoxin A on Livestock Production"; *Toxins* 2, 1796-1824.

Battacone G., Nudda A., Palomba M., Pascale M., Nicolussi P., Pulina G. (2005) "Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to crud whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates"; *J. Dairy Science* ; 88(9):3063-9.

Battacone G., Nudda A., Rassu S.P.G., Decandia M., Pulina G. (2012) "Excretion pattern of aflatoxin M1 in milk of goats fed a single dose of aflatoxin B1"; *J. Dairy Sci.* 95 :2656–266.

Battilani P., Costa L.G., Dossena A., Gullino M.L., Marchelli R., Galaverna G., Pietri A., Dall'Asta C., Giorni P., Spadaro D., Gualla A. (2008) "CFP/EFSA/CONTAM/2008/01 - Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants"; *SCIENTIFIC / TECHNICAL REPORT* submitted to EFSA.

Böhm J., Koinig L., Razzazi-Fazeli E., Blajet-Kosicka A., Twaruzek M., Grajewski J., Lang C. (2010) "Survey and risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food"; *Mycotox Res*; 26:147–153.

Bottalico A. (1999) "Micotossine negli alimenti e possibile rischio per la salute umana"; *Tecnica Molitoria*, 195-219.

Cabras P. e Martelli A. (2004) "Chimica degli alimenti"; PICCIN, Padova, 649-678.

Cappelli P., Vannucchi V. (1998) "Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione"; Zanichelli, 611-623.

CAST: Council of Agricultural Science and Technology (2003) "Mycotoxins: risk in plant, animal and human systems"; Task force report 139, Ames.

Cattaneo T.M.P., Marinoni L., Barzaghi S., Ceremonesi K., Monti L. (2011). "Testing the suitability of different high-performance liquid chromatographic methods to determine aflatoxin M1 in a soft fresh Italian cheese"; Journal of Chromatography A Volume 1218, Issue 29, 4738–4745.

Colavita G. (2008) "Igiene e Tecnologie degli Alimenti di Origine Animale"; Point Veterinaire Italie, 12-239.

Cossu F., Scarano C., Moniello G. Spanu C., Pittau D., Virdis S., De Santis E.P.L. (2011) "Detection of aflatoxin M1 in bulk-tank milk and sheep cheese"; A.I.V.I online Giugno 2011, vol. 1 n. 0.

Devegowda G., Castaldo D. (2000) "Mycotoxins: hidden killers in pet foods. Is there a solution?"; Technical Symposium on Mycotoxins. Alltech, Inc., Nicholasville, KY.

Dragoni I., Cantoni C., Vallone L., Papa A. (1997) "Muffe Alimenti e Micotossicosi"; Città Studi Edizioni, 9-57-62-212-223-233.

Esser K., Lemke P.A., McLaughlin D.J., McLaughlin E.G. (2001) "The Mycota"; vol. VII Systematics and Evolution Part A, Springer, 1778-1781.

Gajecka M., Zielonka L., Dabrowski M., Mróz M., Gajecki M. (2013) "The effect of low doses of zearalenone and its metabolites on progesterone and 17b-estradiol concentrations in peripheral blood and body weights of pre-pubertal female Beagle dogs"; Toxicon 76:260–269.



Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. (2013) "TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer"; *Oncogene*. 2007 Apr 2;26(15):2166-76.

IZS della Lombardia e dell' Emilia Romagna "Bruno Umbertini" (2003) "Lettera di informazione CEREV n.51 Novembre 2003– Appunti sulle Aflatossine"; *Bollettino CEREV - Centro Emiliano Romagnolo di Epidemiologia Veterinaria*, Nov 2013.

Jackson L.C., Kudupoje M.B., Yiannikouris A. (2012) "Simultaneous multiple mycotoxin quantification in feed samples using three isotopically labeled internal standards applied for isotopic dilution and data normalization through ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry"; *Rapid Communication on Mass Spectrometry* 15;26(23):2697-713.

Kang C., Lee H., Yoo Y.S., Hah D.Y., Kim C.H., Kim E., Kim J.S. (2013) "Evaluation of Oxidative DNA Damage Using an Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) Comet Assay, and the Protective Effects of N-Acetylcysteine Amide on Zearalenone-induced Cytotoxicity in Chang Liver Cells"; *Toxicol Res*. Mar;29(1):43-52.

Kokkonen M., Jestoi M. & Rizzo A. (2007). "Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry"; *Food Additives and Contaminants*, 22 (5), 449-456.

Kokkonen M., Jestoi M., Rizzo A. (2005) "Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry"; *Food Additives and Contaminants*, 22:5, 449-456.

Kouadio J.H., Mouka S., Brou K., Gnakri D. (2013) "Lipid metabolism disorders, lymphocytes cells death, and renal toxicity induced by very low

levels of deoxynivalenol and fumonisin b1 alone or in combination following 7 days oral administration to mice”; *Toxicol Int.* Sep-Dec; 20(3): 218–223

Kovalsky M.P., Paris K., Schweiger W., Hametner C., Stuckler R., Muehlbauer G.J., Varga E., Krska R., Berthiller F., Adam G. (2014) “Zearalenone-16 $\alpha$ -O-glucoside: A New Masked Mycotoxin”; *J. Agric. Food Chem.* 62, 1181–1189.

Kramer J. (1990). “Alimenti Microbiologia e Igiene”, OEMF, 51-59

Lattanzio V.M.T., Della Gatta S., Suman M., Visconti A. (2011) “Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-face extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal-based food”; *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 25: 1869-1880.

Leung M.C.K., Di’Az-Ilano G., Smith T.K. (2006) “Mycotoxins in Pet Food: A Review on Worldwide Prevalence and Preventative Strategies”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 54: 9623-9635.

Marasas WF (2001) “Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective” *Environ Health Perspect.* May;109 Suppl 2:239-43.

Mohamed E., Zain, (2010) “ Impact of mycotoxins on humans and animals”; *Journal of Saudi Chemical Society*; 15: 129–144.

Nebbia C. (2002) “Aggiornamento sulla cinetica e sul meccanismo d’azione delle micotossine di interesse per la vacca da latte”; *Large Animals Review*, anno 8, num. 5.

Oueslati S., Romero-Gonzalez R., Lasram S., Garrido Frenich A., Vidal J.L.M. (2012) “Multy-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid crhomatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry”; *Food and Chemical Toxycology* 50; 2376-2381.

Pagliuca G., Lugoboni B., Gazzotti T., Cipollini I., Zaghini G. (2011) "Fumonisin B1 and B2 in dry dog food: preliminary study on commercial samples"; *World Mycotoxin Journal*; 4(4): 439-446.

Peraica M., Radić B, Lucić A, Pavlović M (1999) "Toxic effects of mycotoxins in humans"; *Bull World Health Organ.* 77(9):754-66.

Pietri A. (2001) "Aflatossine nel latte e negli alimenti zootecnici: metodiche analitiche e anamnesi di allevamento (progetto regionale di ricerca dei determinanti la qualità del latte per l'applicazione del Reg. CE 1525 del 16 luglio 1998) - Contaminazione di alimenti da aflatossine: risultati dello studio, aspetti pratici e proposte di controllo"; *Quaderni della ricerca* 2001, 59-71 .

Poóra M., Kunsági-Mátéb S., Tímea Bencsikd T., Petrike J., Sanda Vladimir-Knezevi S., Koszegi T. (2012) "Flavonoid aglycones can compete with Ochratoxin A for human serum albumin: a new possible mode of action"; *International Journal of Biological Macromolecules* 51; 279–283.

Raccomandazione della Commissione Europea n. 576/2006. Raccomandazione sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali (Testo valido ai fini SEE). GU L229 del 17.8.2006.

Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione, del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini SEE). GU L314M dell'1.12.2007.

Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione, del 23 febbraio 2006, relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari (Testo valido ai fini SEE). GU L70 del 9.3.2006.

Regolamento (CE) n. 767/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 13 luglio 2009, sull'immissione sul mercato e sull'uso di mangimi, che modifica il regolamento (CE) . 1831/2003 e che abroga le direttive del 79/373/CEE del Consiglio, 80/511/CEE della Commissione, 82/472 82/471/CEE del Consiglio, 83/228/CEE del Consiglio, 93/74/CEE del Consiglio, 93/113/CE del Consiglio e 96/25/CE del Consiglio e la decisione 2004/217/CE della Commissione (Testo rilevante ai fini del SEE). GU L 229 dell' 1.9.2009.

Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. GU L165 del 30.4.2004.

Regolamento (UE) n. 574/2011 della Commissione, del 16 Giugno 2011, che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di nitrito, melamina, Ambrosia spp. e carry-over di alcuni coccidiostatici e istomonostatici e che consolida gli allegati I e II del Testo rilevante ai fini SEE. GU L159 del 17.06.2011.

Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione, del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE). GU L 364del 20.12.2006.

Rettifica del Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali (GU L165 del 30.4.2004). GU L191 del 28.5.2004.

Rizzi N. (2001) "Aflatossine nel latte e negli alimenti zootecnici: metodiche analitiche e anamnesi di allevamento (progetto regionale di ricerca dei determinanti la qualità del latte per l'applicazione del Reg. CE 1525 del 16

lugio 1998) - Metodologie di campionamento, trattamento, analisi di laboratorio e interpretazione dei referti”; Quaderni della ricerca 2001, 29-47.

Sammon A.M. (2007) “Carcinogens and endemic squamous cancer of the oesophagus in Transkei, South Africa. Environmental initiation is the dominant factor; tobacco or other carcinogens of low potency or concentration are sufficient for carcinogenesis in the predisposed mucosa”; Med Hypotheses. 69(1):125-31. Epub 2007 Jan 26.

Scheideler S.E. (1993) “Effects of various types of aluminosilicates and aflatoxin B1 on aflatoxin toxicity, chick performance and mineral status”; Poultry Science; 72: 282-288.

Smith J.E., Henderson R.S. (1991) “Mycotoxins and animal foods”; CRC Press, 39, 85-87, 628-629.

Soleimany F., Jinap S., Faridah A., Khatib A. (2012). “A UPLC-MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisin, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals”; Food Control 25: 647-653

Sorensen L.K., Elbaek T.H. (2005) “Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry”; Journal of Chromatography B, 820:183-196

Sulyok M., Berthiller F., Krska R., Schuhmacher R. (2006) “Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize”. Rapid Communication Mass Spectrometry; 20: 2649-2659.

Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R. (2010) “Application of an LC–MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds”; Food Chemistry 119: 408–416.

Tampieri M.P. (2004). “Micologia Veterinaria”; Uni.Nova, 5-15.

Tanaka H., Takino M., Sugita-Konishi Y., Tanaka T. (2006) “ development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry method for the simultaneous determination of thricothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs”; *Rapid Communication in Mass Spectrometry*; 20: 1422-1428.

Veldman A., Meijs A.C., Borggreve G.J., Heeres-Van der Tol J.J. (1992) “Carry-over of aflatoxin from cows’ food to milk”; *Animal Production* 55:163-168.

Voss K.A., Riley R.T., J. B. Gelineau-van-Waes J.B. (2005) “Trends in fumonisin research: Recent studies on the developmental effects of fumonisins and *Fusarium verticillioides*”; *Mycotoxins* 55:91-100.

Wogan G.N., Kensler T.W., Groopman J.D. (2011) “Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review”; *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 29(2):249-57.

World Health Organization – International Agency of Research on Cancers (1993) “IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans” VOL.56 “Some Naturally Occurring Substances: Food items and constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins”. IARC press, Lyone (France).

World Health Organization – International Agency of Research on Cancers (2006) “IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans” “PREAMBLE”, IARC press, Lyone (France).

Wu Q., Dohnal V., Huang L., Ku K, Wang X., Chen G., Yuan Z. (2011) “Metabolic Pathways of Ochratoxin A”; *Current Drug Metabolism*, 12, 1-10.

[www.asiagocheese.it](http://www.asiagocheese.it)

[www.cacioricotta.it](http://www.cacioricotta.it)

[www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/mycotoxins](http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/mycotoxins)

[www.fao.org/](http://www.fao.org/)

[www.formaggio.it](http://www.formaggio.it)

[www.parmigianoreggiano.it](http://www.parmigianoreggiano.it)